

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTOREAKTIVIERUNG VON SACCHAROMYCES MIT LICHTBLITZEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
AKIRA YASUI
aus Osaka

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546604_0045

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTOREAKTIVIERUNG VON SACCHAROMYCES MIT LICHTBLITZEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
AKIRA YASUI
aus Osaka



1. Referent: Prof.Dr. W.Laskowski

2. Referent: Ass.Prof.Dr. I.Lamprecht

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 7. 1976

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Photoreaktivierung (PhR)	1
1.2	Das Vorkommen des PRE und seine Bedeutung in der Evo- lution	3
1.3	Problemstellung der PhR Unter- suchung an Saccharomyces Zellen	4
2.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	5
2.1	Stämme und Aufbewahrung	5
2.2	Medien	6
2.3	Vorbereitung der Zellen für die Experimente	6
2.3.1	Anzucht	6
2.3.2	Suspensionsgewinnung	6
2.3.3	Zellgrößenbestimmung	7
2.4	UV-Strahlenquelle und Be- strahlungsbedingungen	7
2.5	Photoreaktivierung (PhR)	8
2.5.1	PhR mit kontinuierlichem Licht	8
2.5.2	PhR durch Lichtblitze mit Hilfe eines Elektronenblitzgerätes	9
2.5.2.1	Verwendetes Licht	9
2.5.2.2	Bestimmung der relativen Blitz- intensität	10
2.5.3	PhR mit Laserblitzen	13
2.5.4	Haltung der Zellen in Puffer (Puffer-Haltung)	18
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	18
3.1	Prüfung der UV-Sensibilität der verwendeten Saccharomyces Stämme	18

3.1.1	Abschattungseffekte bei der UV-Bestrahlung	18
3.1.2	Abtötungseffekt durch Plastik-Haltung der Zellsuspension in Schälchen aus Plastik	21
3.1.3	UV-Sensibilität der Saccharomyces Stämme	22
3.2	Die Untersuchung der Überlebenszunahme durch PhR mit kontinuierlich ausstrahlendem Licht	26
3.3	Photoreaktivierung durch Lichtblitze eines Blitzgerätes	29
3.3.1	Komplexbildung nach UV-Bestrahlung bei haploiden und diploiden Zellen	29
3.3.2	Die Abhängigkeit der PhR von der Intensität des Lichtblitzes	31
3.3.3	Dose-Decrement durch einen Lichtblitz bei haploiden und diploiden Stämmen	34
3.3.4	Die Modifikation des Dose-Decrements durch nichtphoto-reaktivierbare Schäden	38
3.3.5	Die Bestimmung des modifizierten Dose-Decrements beim haploiden und diploiden Stamm	42
3.3.6	Die Bestimmung der Anzahl der PRE-Moleküle in Saccharomyces Zellen verschiedener Stämme	50
3.3.7	Der Komplexbildungsfaktor in haploiden und diploiden Zellen und seine Temperaturabhängigkeit nach UV-Bestrahlung	51

3.3.8	Die Veränderung der Photo- reaktivität mit der Zeit nach UV-Bestrahlung	56
3.4	Photoreaktivierung mit Laserblitzen	61
3.4.1	Inaktivierung und Photo- reaktivierung durch Laser- blitze	61
3.4.2	Wirkungsspektrum der PhR von Saccharomyces Zellen	62
4.	<u>DISKUSION</u>	68
4.1	Modifiziertes Dose-Decrement und maximale PhR	69
4.2	Anzahl der FRE-Moleküle in ha- ploider und diploider Zelle	76
4.3	Abnahme der Photoaktivität durch Puffer-Haltung nach UV-Be- strahlung	80
4.4	Die Rekationskonstanten bei Bildung und Spaltung des Enzym- Substrat-Komplexes	82
4.5	Die Anwendung von Lasern bei der PhR und das Wirkungsspek- trum der PhR	83
4.5.1	Überblick über die medizinischen, biologischen Anwendungen von Laserstrahlen	83
4.5.2	PhR durch Laserblitz	84
4.6	Über den Abschattungseffekt bei UV-Bestrahlung	86
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	88
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	92

1. EINLEITUNG

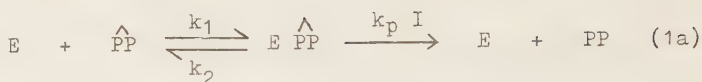
1.1. Photoreaktivierung (PhR)

Der Effekt, daß Überlebensraten von mit ultravioletem Licht (UV) bestrahlten Zellen zunehmen, wenn diese nach der UV-Bestrahlung sichtbarem Licht ausgesetzt werden, wurde zuerst bei der Alge *Fucus furcatus* beobachtet (Whitaker 1941). Seit der fast gleichzeitigen Wiederentdeckung dieses Effekts bei Bakterien (Kelner 1949) und bei Phagen (Dulbecco 1949) wurden viele Organismen entdeckt, die diese Reaktionsfunktion besitzen. Eine Reihe von Untersuchungen (Goodgal et al. 1957, Rupert 1960, 1962a, 1962b) mit UV-bestrahlter Transformations-DNS von *Haemophilus influenza* und Extrakten von *E. coli* oder *Saccharomyces* Zellen hat deutlich gezeigt, daß für diese Reparatur der durch UV verursachten Schäden außer sichtbarem Licht auch ein Enzym (Photoreaktivierungsenzym: PRE) notwendig ist. Der Prozess verläuft nach folgendem Schema:



Ein Komplex ES, der aus einem Molekül des PREs E und einem durch UV entstehenden Substratmolekül S entstanden ist, wird entweder durch eine reversible Reaktion zu E und S oder mit Hilfe der Photonenenergie des sichtbaren Lichts zu E und Produkt P, nämlich dem zum ursprünglichen Zustand zurückverwanderten Produkt, aufgespalten. Photochemische Untersuchungen zeigten, daß die durch UV-Bestrahlung entstehenden letalen Photoprodukte in der DNS zum wesentlichen Teil Cyclobutan Pyrimidindimere sind (Beuker und Berends 1960). Durch Nachbestrahlung mit sichtbarem Licht werden die Dimere in die ursprünglichen Monomere zurückverwandelt (Wulff und Rupert 1962, Setlow und Setlow 1963, Setlow et al. 1965, Cook 1967). Das Reaktionsschema (1), das auf folgende Weise

geschrieben werden kann,



konnte in den zitierten Untersuchungen bestätigt werden. Dabei bedeuten:

$\hat{PP}$	Pyrimidindimer
PP	Pyrimidinmonomere
k_1, k_2	Reaktionskonstanten
$k_p I$	photochemischer Reaktionskoeffizient
k_p	photolytische Konstante
I	Dosisrate des PhRslisches

Setlow (1966) hat gezeigt, daß verschiedene Typen von Pyrimidindimeren (Thymin-Thymin: $\hat{TT}$, Thymin-Cytosin: $\hat{TC}$ und Cytosin-Cytosin $\hat{CC}$) in UV-bestrahlter DNS gebildet werden und Substrate des PREs sind.

Viele Einzelkenntnisse über die PhR wurden mit Hilfe von Lichtblitzen erzielt (Harm, H. und Rupert 1968, Harm, W. et al. 1971). Die Wirkungsweise des PREs entspricht dem für allgemeine enzymatische Vorgänge charakteristischen Michaelis-Menten Reaktionsschema, abgesehen davon, daß zur Aufspaltung des Komplexes Photonenenergie des sichtbaren Lichts nötig ist. Die Verwendung eines Lichtblitzes mit der Dauer von etwa $1/1000$ s kann viele Informationen über die PhR erbringen, weil der Ablauf des zweiten Schrittes ($ES \rightarrow E + P$) durch den Lichtblitz, der die gerade im Augenblick des Blitzes vorhandenen ES-Komplexe aufspaltet, reguliert wird. Experimentell wurde auch bestätigt, daß ein intensiver Blitz tatsächlich alle ES-Komplexe in einer E. coli Zelle aufspalten kann. Diese Methode hat es ermöglicht, nicht nur in vitro sondern auch in vivo (in E. coli Zellen), die beiden Reaktionskonstanten k_1 und k_2 zu bestimmen, nachdem die Anzahl der PRE-Moleküle pro E. coli Zelle als 20 (Harm et al. 1968)

bestimmt worden ist. In fast allen oben genannten in vitro PhRsexperimenten wurde ein Extrakt aus *Saccharomyces* Zellen verwendet. Es wurde auch versucht, PRE-Moleküle aus dem Extrakt zu isolieren, aber wegen der Unstabilität des PRE-Moleküles blieben Versuche zur Reinisolierung des Moleküles erfolglos (Muhammed 1966). Die molekularen Grundlagen der Photoreaktivierung, also der Mechanismus der Spaltung eines Dimers durch ein Enzym, sind noch unbekannt.

Was für eine Bedeutung haben dann in vivo Experimente der PhR? Hier seien vornehmlich zwei Bedeutungen angeführt. Einmal erlaubt eine quantitative Bestimmung des Ausmaßes der PhR in Zellen verschiedener Organismenarten festzustellen, wie das PRE in der Zelle biologisch wirkt. Bei derartigen Untersuchungen kann eine Bestimmung der Anzahl der PRE pro Zelle den Anfang bilden. Die andere Bedeutung der in vivo PhR-Experimente ist im Zusammenhang mit Dunkelreparaturprozessen zu sehen. PhR ist nämlich die einzige Reparatur, durch die nur Pyrimidindimere zu ursprünglich vorhandenen Monomeren perfekt zurückverwandelt werden können. Die Auswirkung von Pyrimidindimeren auf die Reparatur der gesamten UV-induzierten Schäden, sowie die Auslösung von Mutationen, können bestimmt werden, wenn nach UV-Bestrahlung Zellen mit PhRlicht behandelt werden oder nicht. (Eckardt 1974, Kowalski 1975).

1.2. Das Vorkommen der PRE und seine Bedeutung in der Evolution

Die Entdeckung der PhR führte zur Untersuchung ihres Reparaturmechanismus und zur Überprüfung des Vorkommens von PRE-Molekülen bei verschiedenen Organismenarten. Dabei hat sich gezeigt, daß das PRE bei Pflanzen und Tieren weit verbreitet ist (Cook 1970). Außer bei zahlreichen Bakterienarten gibt es PRE auch bei höheren Lebewesen z.B. Fischen und Vögeln. Bislang hatte man angenommen, daß ein PRE Säugerzellen mit Ausnahme der Beuteltiere fehlt (Cook 1970). In jüngster Zeit konnte jedoch auch PhR bei menschlichen

Zellen nachgewiesen werden (Sutherland 1974, Sutherland und Sutherland 1975). Diese Entdeckung hat neuerdings verstärktes Interesse an der PhR eukaryontischer Zelle hervorgerufen.

Folgende Tatsachen deuten darauf hin, daß das PRE in einer früheren Phase der Evolution eine große Rolle gespielt hat. Erstens handelt es sich um einen relativ einfachen Reparaturmechanismus im Vergleich zu anderen bekannten Reparaturmechanismen (Dunkelreparatur). Zweitens ist der Wirkungsgrad der PhR fast 100%. Das heißt, daß PhR ein einfacher und wirkungsvoller Reparaturmechanismus ist. Drittens wurde bisher keine andere Funktion des PRE gefunden als die Reparatur von Pyrimidindimeren. Diese stellen den durch UV-Licht am häufigsten erzeugten Schaden in der DNS dar. Als in der Urzeit die Erdatmosphäre erheblich mehr UV als jetzt auf die Erdoberfläche gelangen ließ, mußte das PRE unter natürlichen Bedingungen einen Selektionsvorteil mit sich bringen. Der Zusammenhang zwischen PhR und Evolution wird in der Diskussion noch einmal aufgegriffen.

1.3. Problemstellung der PhR-Untersuchung an *Saccharomyces* Zellen

Das Ziel dieser Arbeit ist es, durch Verwendung und Verbesserung der ursprünglich für in vitro Untersuchungen der PhR entwickelten Blitz-PhR-Methode und durch Einführung der Laser-Blitz-PhR-Methode die PhR von eukaryontischen Zellen quantitativ und qualitativ zu untersuchen. Folgende Themenbereich werden dabei vornehmlich behandelt:

1. Untersuchung der Komplexbildung zwischen PRE-Molekül und Substrat in der DNS.
2. Bestimmung der Anzahl der PRE-Moleküle in der DNS haploider und diploider Zellen.
3. Bestimmung des Komplexbildungsfaktors und photolytischen Faktors.

4. Untersuchung des Wirkungsspektrum der PhR durch Anwendung von Farbstofflasern.
5. Untersuchung des Zusammenhanges zwischen PhR und anderen Reparaturmechanismen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Stämme und Aufbewahrung

Die folgenden Saccharomyces Stämme wurden verwendet:

Haploide Stämme:

211-1aM	(α , Wildtyp)
S24-12c	(α , rad 2-20)
MB 1030-1A	(α , rad 1-18 rad 2-17, rad 18-2)
478-1d	(α , rad 1, rad 18, rad 51, his 4)

Diploide Stämme:

S2094	(a α , rad 2-20 rad 2-20)
2217	(a α , rad 1-18 rad 1-18, rad 2-17 rad 2-17, rad 18-2 rad 18-2)

a und α sind Symbole für die Paarungstypallele. Gene, die in mutiertem Zustand eine Strahlensensibilität verursachen, werden durch die kleinen Buchstaben rad sowie einer Nummer gekennzeichnet (Game und Cox 1971). Der Stamm 211-1aM wurde von Laskowski (1960), S24-12c und S 2094 von Averbek et al. (1970), 478-1d von B. Cox und MB 1030-1A von M. Brendel aufgebaut. Der Stamm 2217 ging aus einer Kreuzung von zwei geeigneten haploiden Stämmen hervor.

Die rad 1 und rad 2 Mutationen verursachen eine Blockierung des Excision-Repair-Mechanismus (Unrau et al. 1971), während rad 18 einen anderen bisher noch nicht identifizierten Reparaturmechanismus blockiert (Game und Mortimer 1974). rad 51 blockiert mitotische Conversion und Crossing-over (Game und Mortimer 1974).

Alle Hefestämme wurden in Schrägagarröhrchen (Vollmedium) bei 4 C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2. Medien

Es wurde ausschließlich Vollmedium (VM) folgender Zusammensetzung verwendet:

1	%	Yeast-Extrakt (Difco)
0.5	%	Pepton (Merck)
2	%	Glucose
2	%	Agar

Das Medium wurde mit entmineralisiertem Wasser zubereitet und im Autoklaven bei 123 C 30 Minuten lang sterilisiert.

Für die Gewinnung der Zellsuspension und die Verdünnung wurde 0.05 m KH_2PO_4 Puffer benutzt (pH 4.8).

2.3. Vorbereitung der Zellen für die Experimente

2.3.1. Anzucht

Kleine Zellproben wurden den Stammkulturen entnommen und auf VM-enhaltenden Petrischalen bei 30 C 2 Tage lang angezüchtet.

2.3.2. Suspensionsgewinnung

Nach 48 Stunden Anzucht bei 30 C wurden die Zellen, die die stationäre Wachstumsphase erreicht haben, von den Anzuchtplatten mit Puffer abgespült und dreimal bei 3000 Umdrehungen/Min. in frischem Puffer abzentrifugiert, damit die an den Zellen haftenden VM-Reste beseitigt werden. Die auf solche Weise gewaschenen Zellen wurden anschließend in 7 ml Puffer 4.5 Min. lang bei 1000 Umdrehungen/Min. fraktioniert zentrifugiert. 2 ml des Überstandes ohne oberste Schichte, in dem

über 97.5 % Einzelzellen waren, wurden abpipettiert und als Ausgangssuspension verwendet.

2.3.3. Zellgrößenbestimmung

Zur Untersuchung der Zellgrößenabhängigkeit des Abschattungseffekts (3.1.1.) wurde zunächst die Ausgangssuspension durch Geschwindigkeits-Sedimentations-Zentrifugation fraktioniert (Pretlow 1971), die durch die Benutzung von isokinetischen Dichtegradienten aus Ficoll im Zentrifugationsglas die Fraktionierung der Zellen nach den Größen ermöglicht (Nüsse 1973). Die Größe der fraktionierten Zellen wurde mit Hilfe eines elektrischen Partikel-Volumen-Analysators der Firma Telefunken gemessen.

2.4. UV-Strahlenquelle und Bestrahlungsbedingungen

Eine Quecksilber-Niederdruck-Lampe HNS 12 (Osram) wurde zur UV-Bestrahlung benutzt. Die Lampe strahlte vorwiegend das Licht der Wellenlänge 254 nm (ca. 80 %) aus. Die Dosisrate an der Oberfläche der Zellsuspension, die in offenen Bestrahlungsschälchen (Durchmesser 30 mm) mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt und bestrahlt wurde, wurde bei einem Abstand von 40 cm zur UV-Lampe mit einem Quantenflußmesser nach Schaarschmidt (1970) zu $3.2 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2\text{s}$ bestimmt. Bei der Bestrahlung von sehr empfindlichen Zellen (478-1d) wurden zwei Drahtnetze direkt vor die UV-Lampe gelegt und die Dosisrate wurde dadurch auf $3.6 \times 10^{-2} \text{ J/m}^2\text{s}$ verringert. Bei der Bestimmung von κ_1 (Komplexbildungsfaktor) wurde der Abstand zwischen der UV-Lampe und der Suspension so geändert, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit nach UV-Bestrahlung von 1 s etwa 10^{-4} betrug.

Bei der UV-Bestrahlung ist besonders beachtet worden, daß möglichst gleichgroße Bestrahlungsschälchen in gleicher Position unter die UV-Lampe gestellt werden, damit die UV-Dosisrate an der Oberfläche der Suspension bei allen Bestrahlungs-

experimenten gleich blieb.

2.5. Photoreaktivierung (PhR)

2.5.1. PhR mit kontinuierlichem Licht

Zwei Leuchtstoffröhren (Osram L20 W/70) wurden zur PhR mit kontinuierlichem Licht verwendet. Diese Röhren strahlen Licht mit Wellenlängen zwischen 350 nm und 560 nm aus. Das Licht aus den Röhren wurde durch eine Folie (Mylar 500 W/2 : Dupont) gefiltert, die erst für Wellenlängen ab 390 nm durchlässig ist. Dadurch wurde auch langwelliges UV weggefiltert. Der Abstand zwischen den PhR-Röhren und der Suspension war 8 cm bei den Experimenten mit maximaler PhR (3.2.) und 5 cm bei den Experimenten für die Bestimmung des modifizierten Dose-Decrements (3.3.5.). Bei 8 cm Abstand zwischen den PhR-Röhren und der Suspension bekommen die Zellen 5.0×10^{14} Quanten/cm²s von Photonen⁺, deren Wellenlängen zwischen 390 nm und 455 nm liegen, die zur PhR wirksam sind (siehe 3.4.2.).

Bei der Bestimmung des Komplexbildungsfaktors k_1 wurde eine Xenon-Hochdrucklampe (XBO 50; Osram) benutzt. Das Licht dieser Lampe wurde durch einen Filter (WG 345 Jenaer Glaswerk Schott & Gen) gefiltert, der Licht mit Wellenlängen > 345 nm durchläßt. Bei 8 cm Abstand zwischen der Glühbirne und der Suspension betrug die Zahl der Photonen mit Wellenlängen zwischen 345 nm und 450 nm etwa 2×10^{17} Quanten/cm² s⁺, die zur PhR wirksam sind.

Um eine Erhöhung der Suspensionstemperatur während der PhR mit kontinuierlichem Licht zu vermeiden, wurde eine Luftzirkulation durch einen Ventilator erzeugt. Die Suspension wurde während der PhR durch Rührstäbchen mit Hilfe eines

⁺ Diese Messung wurde mit dem Quantendurchflußmesser nach Schaarschmidt (1970) durchgeführt.

Magnetrührers gerührt. Die Temperatur der Suspension während der PhR lag zwischen 22 C und 30 C, wenn keine besonderen Temperaturangaben angeführt sind.

2.5.2. PhR durch Lichtblitze mit Hilfe eines Elektronenblitzgerätes

2.5.2.1. Verwendetes Licht

Zur PhR mit Lichtblitzen wurde ein Photoblitzgerät (Rollei E 36 RE) benutzt, dessen Blitzdauer $1/800$ s (in "Manual"-Stellung) und dessen Blitzenergie (in "Manual"-Stellung) 80 Js beträgt. Die Spektrumverteilung des Blitzlichtes wird in Abb. 1 angegeben. Etwa 42 % von der gesamten Intensität kommt von den Photonen der Wellenlängen zwischen 380 nm und 460 nm, die photoreaktivieren können (Siehe 3.4.2.). Zwischen Blitzlicht und Suspension wurde ein Glasfilter WG 320 (Schotte & Gen.) angebracht, damit nur Wellenlängen von mehr als 320 nm die Hefezellen erreichen. Ein Blitz wurde erst dann ausgelöst, wenn der Pfeifton des Ladevorgangs mit hörbarem Klicken aussetzt. Mit Hilfe einer Photodiode wurde nachgewiesen, daß bei Auslösung unmittelbar nach dem Pfeifton eine gleichmäßige maximale Blitzintensität zu erzielen ist.

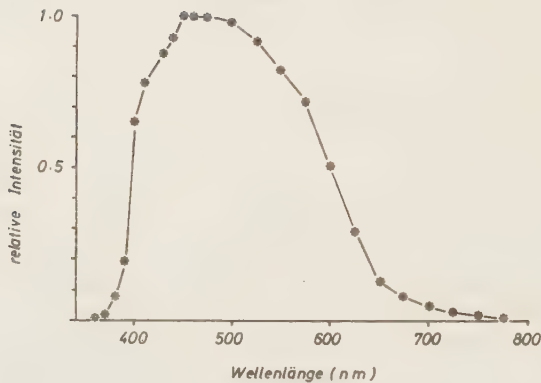


Abb. 1 Spektrum der Rollei-Blitzlampe (Rollei E 36 RE). Aufgenommen mit dem Monochromator Carl Zeiss MM 12, mit dem Abstand von 50 cm zwischen der Blitzlampe und dem Monochromator. (Persönliche Mitteilung von A. Anders und I. Lamprecht 1974).

2.5.2.2. Bestimmung der relativen Blitzintensität

Zur Bestimmung der relativen Blitzintensität wurden eine Photodiode und ein Oszillograph benutzt. Die Photodiode wurde unter das Bestrahlungsschälchen gelegt und die Intensitäten der Blitze mit dem Oszillographen aufgenommen. Die so erhaltenen Werte wurden mit Eichkurven verglichen, die unter Verwendung bekannter Lichtfilter gewonnen worden waren. Derart konnte die relative Intensität der Lichtblitze bestimmt werden. Abb. 2a zeigt Oszillogramme, auf denen die

relative Lichtintensität und das zeitliche Abklingen der Lichtblitze bei Verwendung verschiedener Neutral (Grau) - Gläser, die Licht von allen Wellenlängen gleichmäßig abschwächen, zu erkennen ist. Die Höhe des Anfangs der Oszillogramme entspricht der gesamten Intensität des Blitzlichtes, das die Photodiode erreicht hat.

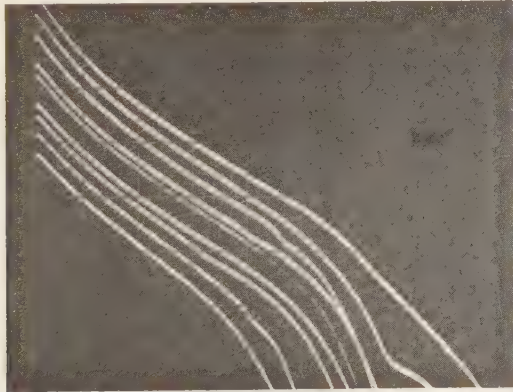


Abb. 2a Oszillogramme unter Verwendung verschiedener Neutral (Grau)-Gläser (Schott & Gen) zwischen dem Blitzgerät und der Photodiode. Verwendete Neutral-Gläser sind NG 9 von unterschiedlicher Dicke. Das Absorptionsvermögen der Gläser war 0.995, 0.9975, 0.999, 0.9995, 0.99975, 0.9999, 0.99995, 0.999975 und 0.99999 von der obersten Lichtspur bis zur untersten im Bild. Auf der Ordinate ist die relative Lichtintensität abzulesen, und auf der Abszisse ist die Abklingzeit des Lichtblitzes mit 0.2 ms pro Streckeneinheit erkennbar.

Abb. 2b ist ein Bild von den durch variierte Abstände zwischen dem Blitzgerät und der Photodiode gewonnenen Intensitätsunterschieden der Blitze. Durch Änderung der Abstände können unterschiedliche Intensitäten der Blitzlichte an der Suspension, die auf der Photodiode liegt, beliebig gewonnen werden.

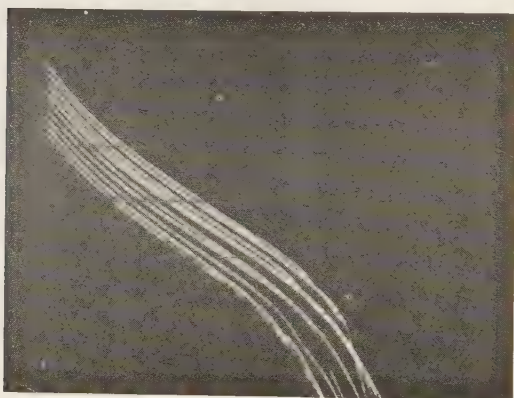


Abb. 2b Oszillogramme von den durch variierte Abstände zwischen dem Blitzgerät und Photodiode erhaltenen unterschiedlichen Intensitäten an der Photodiode (Achsen wie in Abb. 2a).

Für die Experimente wurden Bestrahlungsschälchen aus Plastik benutzt. Der gleichmäßig dicke und plane Boden der Plastischälchen sowie seine gleichmäßige Beschaffenheit gewährleisteten einen relativ konstanten Lichteinfall auf die Photodiode unter dem Schälchen. Diese Bedingungen werden von Glasschälchen nicht erfüllt. Wegen des Inaktivierungseffektes von Plastischälchen (siehe 3.1.2.) wurden diese nur für sehr kurzfristige Blitzversuche verwendet.

2.5.3. PhR mit Laserblitzen

Zur Bestimmung des Wirkungsspektrums von photoreaktivierendem Licht auf *Saccharomyces* Zellen wurden zwei Farbstofflaser (Zeiss FL3B und Molelectron DL300/ μ V 1000) unter Verwendung einer Reihe verschiedener Farbstoffe benutzt. Zur PhR mit Wellenlängen von 370 nm, 380 nm, 397 nm und 337 nm wurde der Molelectron und Nitrogen Pump Laser verwendet. Noch kürzere Wellenlängen von 306 nm und 330 nm wurden mit dem Zeiss Laser nach Frequenzverdopplung erreicht. In Tabelle 1 sind die Farbstofflaser mit Lösungsmitteln, fundamentalen Wellenlängen, Wellenlängen nach Frequenzverdoppelung und ihren Intensitäten angegeben.

Tabelle 1 Die in den Laserexperimenten verwendeten Farbstoffe (Anders et al. 1975)

Laser	Farbstoff	Lösungs- mittel	Wellenlängen		Energie pro Blitz (μJ)
			fundamental	nach Frequenz- verdoppelung	
Zeiss FL3B	Rhodamin 6G	Methanol	612	306*	1000
	Rhodamin 6G + Cresylviolett Perchlorate	Methanol	660	330*	1.5
Nitrogen Pump Laser UV 1000	—	—	337*	—	8000
Zeiss FL3B	Nile Blue Perchlorate + Rhodamin B	Methanol	710	355*	2.5
	Nile Blue Perchlorate	Methanol	734	367*	6
Molelectron DL 300	PPO	Ethanol/ Toluene	370*	—	30
UV 100	PPO	Ethanol/ Toluene	380*	—	10
	PPBO	Ethanol/ Toluene	397*	—	70
Zeiss	Coumarine 2	Methanol	428*	—	155
FL3B	Coumarine 102	Methanol	460*	—	1300

*Diese Wellenlänge wurde zum PhR-Experiment verwendet.

Da der Durchmesser der Laserstrahlen zu klein zur Verwendung normaler Bestrahlungsschälchen ist (der Durchmesser der Laserstrahlen, Zeiss: 3 mm, Molelectron: 1,8 mm), wurde die PhR mit Laserblitzen auf folgende Weise durchgeführt. Auf die Oberfläche einer Agarplatte (2 % Agar) in einer Petrischale wurden mit Hilfe einer Schablone (Abb. 3) 8 kleine Agarblöcke von jeweils 3 mm Durchmesser in einer Reihe angeordnet.

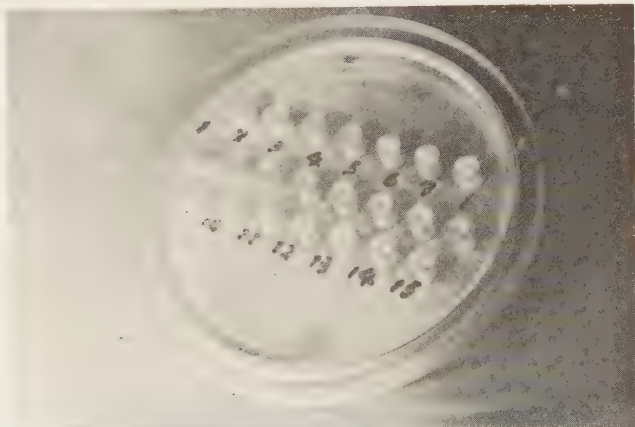


Abb. 3 Schablone aus Plastik zum exakten Einsetzen von Agarblöcken auf eine Agarplatte.

Die Platten mit dem Agarmedium für die Agarblöcke wurden vor der Herstellung der Agarblöcke 10 Tage bei 30 C liegen gelassen, damit die Agarblöcke so trocken wurden, daß die aufzutropfende Flüssigkeit gut aufgesaugt wird. Nach UV-Bestrahlung der Hefezellen wurden jeweils 5 μ l der UV-bestrahlten Zellsuspension mit einem Titer von 8×10^2 Zellen pro μ l auf einen Agarblock pipettiert. Nachdem die Flüssigkeit in den Agarblock eingezogen war (ca. 40 Min., diese Zeit dient auch zur maximalen Komplexbildung zwischen PRE-Molekülen und Substraten),

wurden die Petrischale mit den 8 Agarblöcken senkrecht gestellt und die Blöcke nacheinander in den Strahlengang des Lasers geschoben und mit je einem Puls belichtet. Zur Bestimmung der Photoreaktivität wurden die Zellen 10 mal oder 20 mal in zeitlichen Abständen von jeweils 3 Min. belichtet. Nach dieser Behandlung wurden die Agarblöcke in Puffer übertragen, die Zellen abgespült und auf VM ausgeplattet.

Zur Halterung und reproduzierbaren Bestrahlung der Agarblöcke diente ein Schlittensystem, das in Abb. 4 gezeigt ist. Die Petrischale aus Plastik ruht von 4 Schrauben gehalten auf einer Fläche, die zur genauen Justierung im Strahlengang horizontale Linien und mehrere Fluoreszenzpunkte enthält. Sie läßt sich auf einer waagerechten Achse zwischen mehreren Rastrienen verschieben, die genau den Positionen der Agarblöcke entsprechen. Abb. 5 gibt den ganzen Aufbau der experimentalen Vorrichtungen.

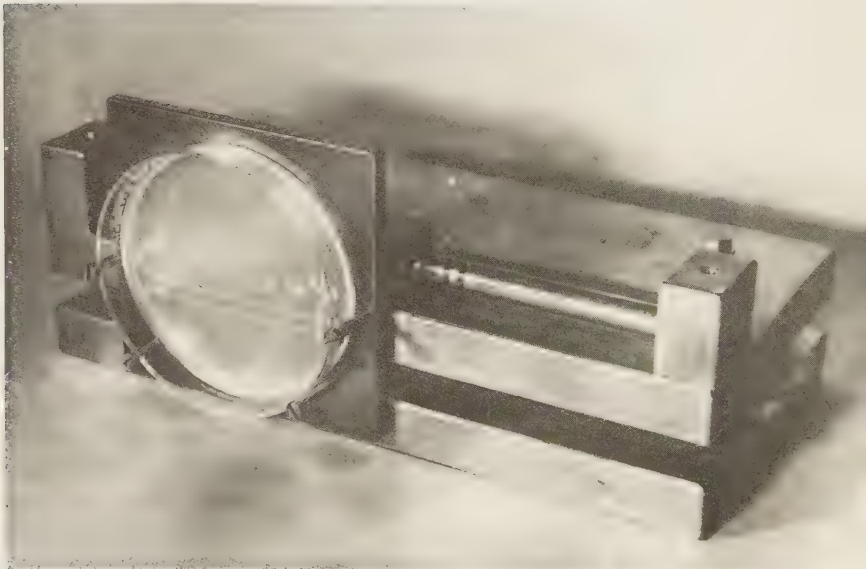


Abb.4 Schlittensystem mit einer Petrischale. 8 Agarblöcke sind zu sehen, auf die Zellen aufpipettiert wurden.

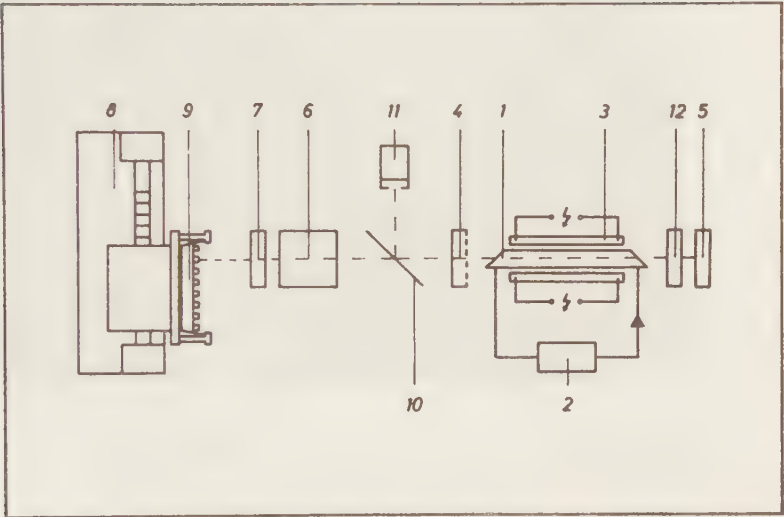


Abb. 5 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der Laser Bestrahlung (Anders et al. 1975)

1. Farbstofflaser-Küvette
2. Umlaufsystem mit Pumpe für Farbstoff
3. Blitzlampen für das optische Pumpen
4. Auskoppelspiegel
5. Totalreflektierender Spiegel
6. KDP-Kristall für Frequenzverdoppelung
7. Filter zur Absorption des sichtbaren Lichtes (fundamentale Wellenlänge)
8. Halterung
9. Petrischale mit Agarblöcken
10. Glasplatte zum Auskoppeln
11. Lichtmeßgerät
12. Interferenzfilter



Abb. 6 (Zeiss Laser). Bei der Durchführung eines Laser Experimentes.

2.5.3. Haltung der Zellen in Puffer (Puffer-Haltung)

Zur Untersuchung der Änderung der Photoreaktivität mit der Zeit nach UV-Bestrahlung (3.3.8.) wurden UV-bestrahlte und unbestrahlte (Kontroll) Zellsuspensionen in Glaskolben im Dunkeln geschüttelt aufbewahrt.

Bei Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde immer die Zahl des Überlebende der Kontrollsuspension als 100 % gesetzt. Die Temperatur bei der Aufbewahrung war immer 30 C.

3. Ergebnisse

3.1. Prüfung der UV-Sensibilität der verwendeten Saccharomyces Stämme

3.1.1. Abschattungseffekte bei der UV-Bestrahlung

Wegen Absorption und Streuung der ausgestrahlten Photonen

durch die Zellsuspension kann die auf der Oberfläche der Zellsuspension gemessene Lichtdosis größer als die in der gesamten Suspension wirksame Licht-Dosis sein. Dieser Abschattungseffekt durch Zellen hängt von der Länge des Lichtweges in der Suspension, der Konzentration der Zellen und deren Größe ab. Abb. 7 zeigt den Abschattungseffekt annähernd gleich großer Zellen (etwa $25 \mu\text{m}^3$ ist das durchschnittliche Volumen der haploiden Zellen, die nach Fraktionierung als Ausgangssuspension verwendet wurden) von zwei UV-empfindlichen Haplonten. Die Länge des Lichtweges in der Suspension war 5 mm, wie bei allen anderen Experimenten in der Regel. In beiden Stämmen mit unterschiedlicher UV-Empfindlichkeit können die Zellen unter diesen Bestrahlungsbedingungen bis zu einem Titer von etwa $2 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ ohne erkennbaren Abschattungseffekt bestrahlt werden.

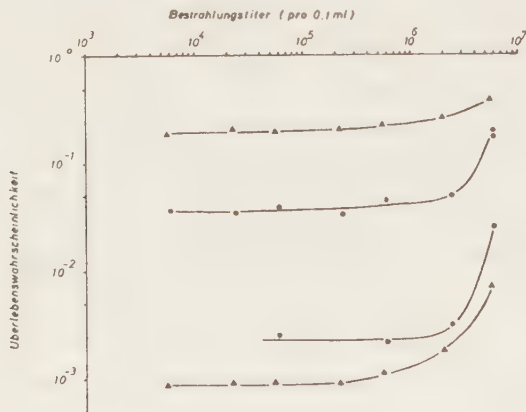


Abb. 7 Bestrahlungstiterabhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit des haploiden Stammes MB 1030-1A (●: UV-Bestrahlung mit $5.4 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ oben und $9.0 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ unten) und des haploiden Stammes S24-12c (▲: UV-Bestrahlung mit 1.8 J/m^2 oben und 4.0 J/m^2 unten)

Die Größe der Zellen beeinflusst natürlich auch den Abschattungseffekt. Abb. 8 zeigt die Extinktion von 254 nm UV-Licht durch Zellsuspensionen verschiedener Zellgröße (Stamm MB 1030-1A). Der Lichtweg in der Suspension war in diesem Fall 10 mm lang. Bei doppeltem Zellvolumen muß der Titer auf ein Drittel reduziert werden, um eine gleiche Extinktion zu erhalten. Nach Extrapolierung kann die Abschattung beim Zellvolumen von $15.6 \mu\text{m}^3$ (kleine haploide Zellen) ab $1 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$ (bei 5 mm langen Lichtweg ist der entsprechende Wert $2 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$) eintreten, aber bei $33.7 \mu\text{m}^3$ (große haploide Zellen) schon ab $3 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml}$ (bei 5 mm langen Lichtweg: $6 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml}$). Bei den zur Untersuchung der PhR mit Photoblitz und Laserblitz verwendeten haploiden Zellen, deren Volumen durchschnittlich $25 \mu\text{m}^3$ betrug, tritt ein Abschattungseffekt bei Titern größer als $1 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$ bei 5 mm langen Lichtweg auf. Bei Bestrahlung diploider Zellen nach gleicher Fraktionierung (gleiche Zentrifugierungszeit und gleiche Menge von Suspension) wie bei haploiden Zellen, tritt Abschattung wegen des größeren Zellvolumens schon bei kleineren Titern auf. Da eine exakte Angabe der UV-Dosis für die folgenden Untersuchungen sehr wichtig ist, wurde entweder die bestrahlte Suspensionsmenge verringert, um den Lichtweg zu verkürzen, oder die wirksame Dosis aus Dosis-Effekt-Kurven errechnet, wenn die verwendeten Titer die oben angegebenen Werte notwendigerweise überschreiten mußten.

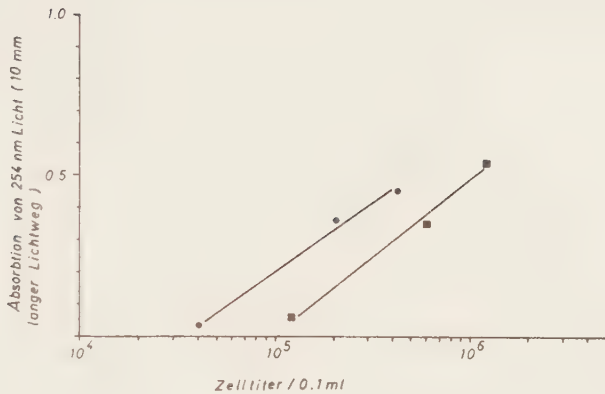


Abb. 8 Zelltiterabhängigkeit der Absorption von 254 nm Licht durch kleine Zellen mit einem Volumen von $15.3 \mu\text{m}^3$ ($\blacksquare$) und durch große Zellen $33.7 \mu\text{m}^3$ ($\bullet$).

3.1.2. Abtötungseffekt durch Plastik während der Haltung der Zellsuspension in Schälchen aus Plastik

Während der Bestrahlungsversuche stellte sich heraus, daß Hefezellen in Petrischalen aus Plastik (Plastik-Schälchen) abgetötet werden. Abb. 9 zeigt die Inaktivierung von Stamm MB1030-1A durch Aufbewahrung in Plastik-Schälchen bei verschiedenen Temperaturen. Die Abtötung nimmt bei Erhöhung der Temperatur deutlich zu. Dieser Abtötungseffekt von Plastik ist beim Wildtyp-Stamm kaum zu beobachten. Bei Stamm S24-12c (rad 2-20) mit einer mittleren UV-Empfindlichkeit tritt nach 3 Stunden Aufbewahrung in Plastik-Schälchen eine 5 %ige Abtötung bei 22 °C und eine 15 %ige Abtötung bei 30 °C auf. Diese Abtötung beider Stämme verschwand, wenn die Zellen in Glasschälchen aufbewahrt wurden. Um diesen Abtötungseffekt zu vermeiden, wurden außer für die Bestimmung der Inten-

sitätsabhängigkeit der Blitz-PhR und der k_1 -Werte nur Glas-schälchen benutzt.

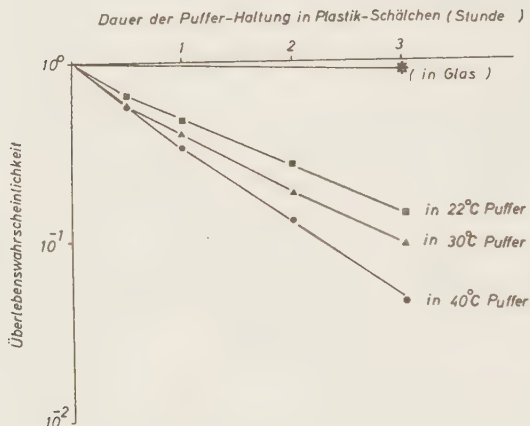


Abb. 9 Abtötung von Stamm MB 1030-1A durch Plastik-Schälchen während der Haltung der Zellsuspension bei verschiedenen Suspensionstemperaturen. Die Temperatur bei Haltung in Glas-schalen war 22 C.

3.1.3. UV-Sensibilität der Saccharomyces Stämmen

Voraussetzung für Untersuchungen der PhR ist zunächst eine Ermittlung der UV-Dosis-Effekt-Kurve (DEK) jedes Stammes. Abb. 10 zeigt die DEK für die UV-Sensibilität des Kolonie-bildungsvermögens des später mit Lichtblitzen photoreakti-vierten haploiden Stammes MB 1030-1A und des diploiden Stammes 2217. Abb. 11 zeigt die DEK für einen etwas resistenteren haploiden Stamm (S24-12c) sowie einen entsprechenden di-ploiden Stamm (S2094). In Abb. 12 ist die DEK des haploiden Wildtyp-Stammes 211-1aM und in Abb. 13 die entsprechende DEK für den extrem UV-sensibelen haploiden Stamm 478-1d wieder-gegeben. Wie zu sehen ist, zeigen die DEK für den haploiden

Wildtyp-Stamm und die beiden diploiden Stämme einen deutlichen Schulterbereich, während ein solcher bei den haploiden Stämmen 478-1d, MB 1030-1A und S24-12c kaum ausgeprägt ist.

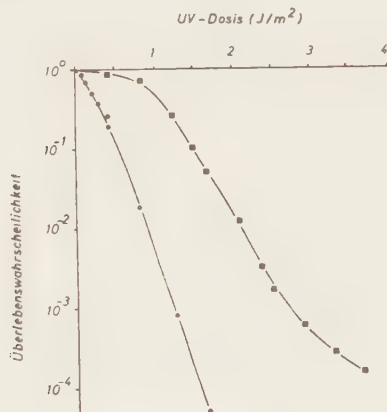


Abb. 10 DEK des haploiden Stammes MB 1030-1A (●) und des diploiden Stammes 2217 (■).

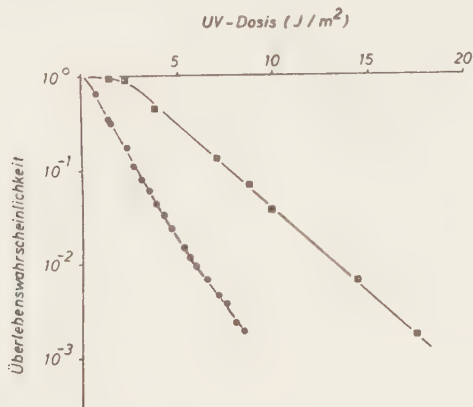


Abb. 11 DEK des haploiden Stammes S24-12c (●) und des diploiden Stammes S 2094 (■).

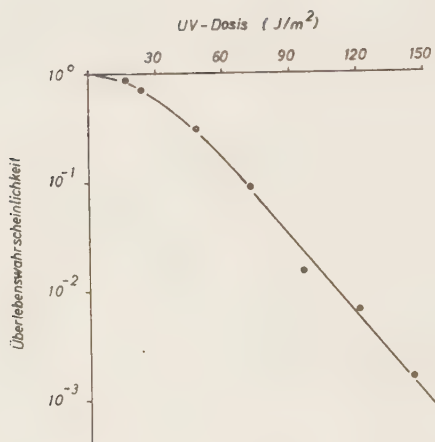


Abb. 12 DEK des haploiden Wildtyp-Stammes 211-1aM

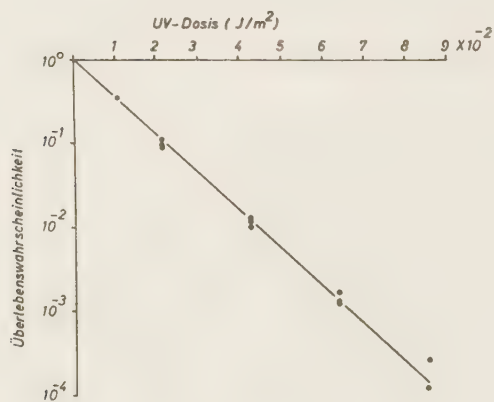


Abb. 13 DEK des haploiden Stammes 478-1d

Als Maß der Sensibilität kann die Letal-Dosis 37 (LD 37) benutzt werden. Das ist diejenige UV-Dosis, die die Überlebenswahrscheinlichkeit auf 37 % reduziert. Bei einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 37 % gibt es nach der Poisson-Verteilung durchschnittlich einen letalen, nach Reparaturprozessen übrigbleibenden Schaden pro inaktivierter Zelle. Um das Reparaturvermögen der sensiblen Stämme quantitativ zu charakterisieren, kann das Verhältnis der LD 37 sensibler Stämme zur LD 37 des Wildtyp Stammes als Dosis-Reduktions-Faktor (DRF) angegeben werden. Da die DEK nicht bei allen Stämmen in allen Dosisbereichen gradlinig verlaufen, sondern einige DEK Schulter- oder Schwanzbereich haben, ist der DRF davon abhängig, mit welcher Überlebenswahrscheinlichkeit gerechnet wird. In Tabelle 2 werden Werte für die LD 37 sowie für LD 1 (Letal-Dosis, die zu 1 % Überlebenden führt) angegeben. Die LD 1 liegt stets außerhalb des Schulter- und Schwanzbereichs der DEK. Die entsprechenden DRFs sind ebenfalls in Tabelle 2 notiert. Wie man sieht, sind die Abweichungen nicht groß.

Tabelle 2 Dosis-Reduktions-Faktoren der in der Arbeit verwendeten Stämme

Stamm	rad Gen	LD 37 (J/m ²)	LD 1 (J/m ²)	DRF (37)	DRF (1)
Haplonten:					
211-1aM	+	4.3x10 ¹	7.0x10 ¹	1	1
S24-12c	rad 2-20	1.3x10 ⁰	2.8x10 ⁰	33	25
MB 1030-1A	rad 1-18, rad 2-17, rad 18-2	2.5x10 ⁻¹	4.8x10 ⁻¹	172	146
478-1d	rad 1, rad 18, rad 51	1.3x10 ⁻²	2.4x10 ⁻²	3300	2900
Diplonten:					
S2094	rad 2-20 rad 2-20	3.8x10 ⁰	6.7x10 ⁰	11	10
2217	rad 1-18 rad 1-18 rad 2-17 rad 2-17 rad 18-2 rad 18-2	1.0x10 ⁰	1.4x10 ⁰	43	50

Wie aus Tab.2 zu ersehen ist, beträgt die LD 37 des UV-empfindlichsten Stammes $1.3 \times 10^{-2} \text{ J/m}^2$. Daraus folgt, daß durch UV-Bestrahlung mit einer Dosis von 1 J/m^2 7.7×10^1 letale Schäden in der DNS verbleiben. Da die mit biochemischen Methoden ermittelte Zahl der Pyrimidindimere pro haploides Genom pro J/m^2 etwa 300 ist (siehe 3.3.6.), ergibt sich, daß entweder 3/4 der Dimere trotz der drei mutierten rad Gene noch repariert werden oder daß sie keinen Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit haben. Schäden, außer Pyrimidindimeren, werden bei dieser Abschätzung vernachlässigt.

Die Bestimmung der Anzahl der PRE wurde bei den haploiden Stämmen S24-12c und MB 1030-1A, und den diploiden Stämmen S2094 und 2217, vorgenommen. Diese Stämme sind für Blitz-PhR-Versuche geeignet, weil, wie später zu sehen sein wird, der Quotient aus der Zahl der PRE-Moleküle pro Zelle und der Zahl der Pyrimidindimere pro Zelle bei allen meßbaren Überlebenswahrscheinlichkeiten groß genug zur Hervorbringung eines erkennbaren Blitzeffektes ist, gleichzeitig aber auch klein genug ist, die Bildung der maximalen Anzahl von Komplexen zwischen PRE-Molekülen und Substraten zu gestatten. Zur Untersuchung der chemischen Komplexbildungskonstanten wurden der haploide Stamm MB 1030-1A und der diploide Stamm 2217 benutzt. Zur Bestimmung des Wirkungsspektrums der PhR wurde ebenfalls MB 1030-1A benutzt. Bei den Untersuchungen der Komplexbildungskonstanten und des Wirkungsspektrums werden die Zellen mit UV bis auf eine Überlebenswahrscheinlichkeit inaktiviert, die einem geradlinigen Teil der in halb-logarithmischem Raster aufgetragenen DEK zugehört.

3.2. Die Untersuchung der Überlebenszunahme durch PhR mit kontinuierlich ausstrahlendem Licht

Wenn UV-bestrahlte Zellen unter kontinuierlich ausstrahlendes Licht, dessen Wellenlänge länger als 350 nm ist, gebracht werden, ist eine Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit

mit zunehmender Zeit unter dem Licht zu beobachten. Dieses einfache Experiment zeigt, daß die PhR Licht-Dosis abhängig ist. Abb. 14 zeigt die Zunahme der Überlebenden der mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlten Zellen bei vier haploiden Stämmen mit unterschiedlicher UV-Empfindlichkeit. Bei allen PhR-Experimenten war die Intensität des kontinuierlichen Lichts gleich.

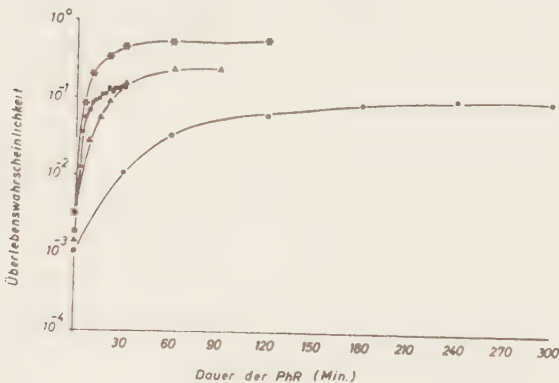


Abb. 14 PhR haploider Stämme mit kontinuierlich ausgestrahltem Licht mit gleicher Lichtdosisrate

- Wildtyp-Stamm (UV-Dosis 110 J/m²)
- * Stamm 24-12c (UV-Dosis 8 J/m²)
- Stamm MB 1030-1A (UV-Dosis 1 J/m²)
- ▲ Stamm 478-1d (UV-Dosis 6 x 10⁻² J/m²)

Die UV-Dosisabhängigkeit der Rate der UV-Schadensreparatur durch kontinuierliches PhR-Licht von gleicher Intensität wird in Abb. 15 gezeigt. Bei der Berechnung von der Schadensreparatur wurde die Zahl der pro J/m² produzierten Pyrimidindimere als 3.2 x 10². (Fäth und Brendel 1975, siehe 3.3.6.)

angenommen und die gesamte Zahl der Schäden durch die für eine maximale PhR notwendige Zeit dividiert. Die Rate der UV-Schadensreparatur nimmt mit zunehmender UV-Dosis zu und erreicht einen maximalen Wert von etwa $8 \times 10^0/s$ bei der PhR des Wildtyp-Stammes nach der Bestrahlung mit großen UV-Dosen. Da die Zahl der Pyrimidindimere geradlinig mit zunehmender UV-Dosis zunimmt (Waters und Moustacchi 1975), kann man annehmen, daß alle PRE-Moleküle während der PhR nach Bestrahlung mit großen UV-Dosen mit Substraten Komplexe bilden. Der Wert der maximalen Schadensreparatur-Rate von $8 \times 10^0/s$ charakterisiert daher die photolytische Konstante unter diesem PhR-Licht und den PhR-Bedingungen.

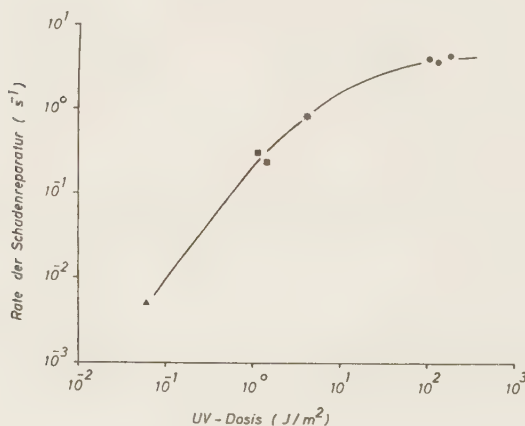


Abb. 15 Rate der Schadensreparatur von vier Stämmen in Abhängigkeit von der UV-Dosis. ● Wildtyp-Stamm, ★ Stamm S24-12c, ■ Stamm MB 1030-1A, ▲ Stamm 478-1d

3.3. Photoreaktivierung durch Lichtblitze eines Blitzgerätes

3.3.1. Komplexbildung nach UV-Bestrahlung bei haploiden und diploiden Zellen

Durch Anwendung von Lichtblitzen kann die Komplexbildung zwischen PRE und Substrat eingehend untersucht werden, weil die Aufspaltung des Komplexes durch einen Blitz stattfindet und nur diejenigen Komplexe aufgespalten werden können, die gerade im Augenblick des Blitzes vorhanden sind. Abb. 16 zeigt die UV-DEK (linke Kurve) und die Ergebnisse der PhR durch einen Lichtblitz zu verschiedenen Zeiten nach UV-Bestrahlung (rechte Kurve) für den haploiden Stamm MB 1030-1A. Bereits eine Minute nach UV-Bestrahlung kann durch einen Blitz fast 70 % der maximal möglichen Zunahme an Überlebenden erreicht werden. Eine Zeitspanne von etwa 20 Minuten ist aber notwendig, um die maximale Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch einen Blitz zu erreichen. Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich auch für den diploiden Stamm 2217 (Abb. 17). Diese 20 Minuten werden in Übereinstimmung mit der Interpretation von PhR-Experimente mit *E. coli* (Harm, W. et al. 1971) als notwendige Zeitdauer für eine maximale Komplexbildung zwischen PRE-Molekülen und Substraten angesehen.

Abb. 16 Blitz-PhR.
PhR von MB1030-1A
durch einen Licht-
blitz in Abhängig-
keit von der Zeit
zwischen UV-Be-
strahlung und Licht-
blitz. Die linke
Kurve ist die UV-DEK

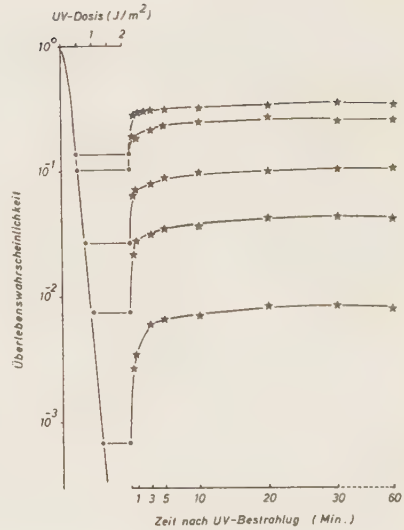
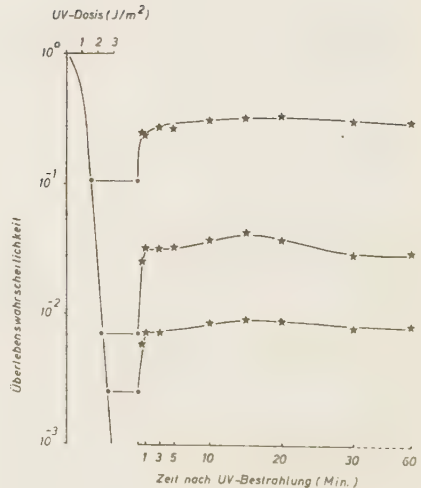


Abb. 17
PhR des diploiden
Stammes 2217 durch
einen Lichtblitz zu
verschiedenen Zeiten
nach der UV-Be-
strahlung. Links UV-DEK



Bei Stamm 2217 ist aber deutlich zu sehen, daß bei einem Zeitintervall von mehr als 20 Minuten zwischen UV-Bestrahlung und Lichtblitz die Zunahme der Überlebenden geringer wird. Dieser Effekt wurde auch bei Stamm MB 1030-1A ab 2 Stunden nach UV-Bestrahlung gefunden (siehe 3.3.8.). In 3.3.8. werden die Ergebnisse dieses Effektes mit MB 1030-1A weiter beschrieben.

Diese Ergebnisse über die Zeitabhängigkeit der maximalen Komplexbildung nach UV-Bestrahlung wurden in allen folgenden Experimenten berücksichtigt und Blitz-PhR (auch beim Laser-Blitz) immer erst nach maximaler Komplexbildung nach UV-Bestrahlung durchgeführt.

3.3.2. Die Abhängigkeit der PhR von der Intensität des Lichtblitzes

Durch Änderung der Zahl der Photonen, die die UV-bestrahlten Zellen erreichen können, kann die zur maximalen PhR notwendige Blitzintensität bestimmt werden. Die Messung der relativen Intensität des ausgestrahlten Lichtblitzes wurde durch die Benutzung einer Photodiode ermöglicht (siehe 2.5.2.2.). Abb. 18 zeigt die Abhängigkeit der relativen Photoreaktivität von der Intensität des Lichtblitzes. Die Vierecke in der Abbildung bedeuten theoretische Punkte, die unter folgenden Voraussetzungen berechnet worden sind.

- 1.) Treffer von Photonen auf Komplexe erfolgen zufällig, d.h. alle Komplexe haben gleiche Reaktionsfähigkeit mit einem Photon.
- 2.) Der Punkt von 3×10^{-2} der relativen Intensität des Blitzlichts ist aus den experimentellen Ergebnissen als Ausgangspunkt ausgewählt worden.

Die experimentellen Punkte stimmen gut mit den theoretischen Punkten überein. Ab 6×10^{-1} der relativen Photoreaktivität liegt aber die theoretische Kurve etwas höher als die im Experiment erhaltenen Punkte.

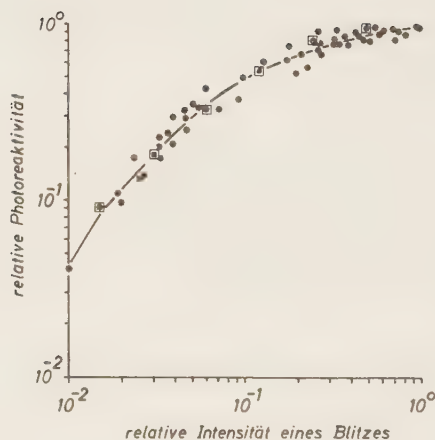


Abb. 18 Abhängigkeit der PhR von der Intensität des Lichtblitzes (siehe Text zur weiteren Erklärung)

Abb. 19 zeigt deutlich, daß eine maximale Blitz-PhR bereits durch einen Blitz erreicht werden kann. Nach maximaler Komplexbildung nach UV-Bestrahlung mit einer UV-Dosis von 1 J/m^2 (mit dem Symbol ●) wurden die bestrahlten Zellen mit einem Rollei E 66 Blitzgerät (dieses Gerät wurde sonst nicht verwendet) photoreaktiviert (A), mit einem Rollei E - 36 RE Blitzgerät, das in dieser Arbeit stets benutzt wurde, (B), mit zwei Blitzgeräten gleichzeitig (C), oder mit drei Blitzgeräten gleichzeitig (D) photoreaktiviert. Wegen räumlichen Schwierigkeiten der Anordnung der Blitzgeräte nimmt die Intensität bei Zunahme eines Blitzgerätes

nur um etwa 30 % zu. Es erfolgt aber keine Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch die Intensitätserhöhung bei Verwendung von 3 Blitzgeräten.

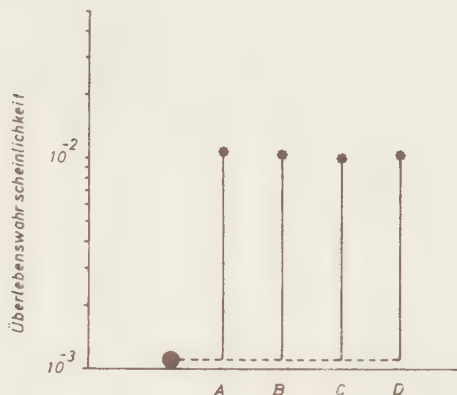


Abb. 19 Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch PhR mit verschiedener Intensität des Blitzes (A: durch einen Blitz (Rollei E 66), B: durch einen Blitz (Rollei E-36 RE), C: durch zwei Blitze, D durch drei Blitze)

3.3.3. Dose-Decrement durch einen Lichtblitz bei haploiden und diploiden Stämmen

Nach UV-Bestrahlung und maximaler Komplexbildung (siehe 3.3.1.) wurden die bestrahlten Zellsuspensionen einem Lichtblitz ausgesetzt, der eine für die Spaltung aller vorhandenen Komplexe genügende Lichtintensität besaß (siehe 3.2.2.). Abb. 20 und 21 zeigen die UV-DEK ohne und mit PhR durch einen Lichtblitz nach maximaler Komplexbildung von 2 haploiden und diploiden Stämmen.

Abb. 20 DEK und PhR durch einen Blitz nach maximaler Komplexbildung (DEK vom haploiden Stamm MB 1030-1A mit Symbol ● und Blitz-PhR mit Symbol ○, DEK vom diploiden Stamm 2217 mit Symbol ■ und Blitz-PhR mit Symbol □)

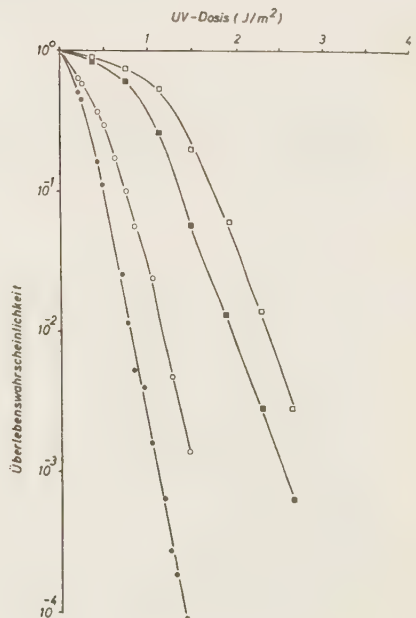
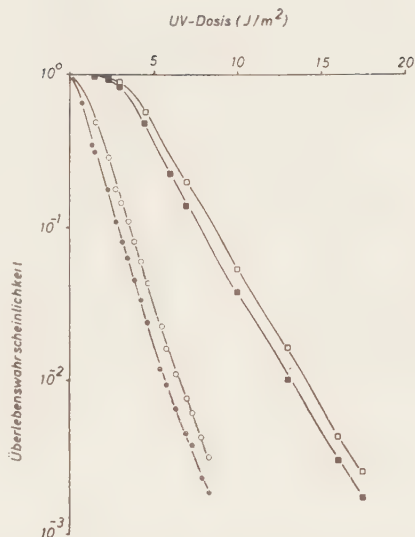


Abb. 21 DEK und PhR durch einen Blitz nach maximaler Komplexbildung (DEK von haploidem Stamm S24-12c mit Symbol ● und Blitz-PhR mit Symbol ○, DEK von diploidem Stamm S2094 mit Symbol ■ und Blitz-PhR mit Symbol □)



Die UV-Dosis, die durch die PhR annulliert wird (siehe Abb. 22), ist das Dose-Decrement durch die PhR nach UV-Bestrahlung mit einer UV-Dosis. Die Größe des Dose-Decrements entspricht der Menge der durch die PhR reparierten Schäden (Harm, Rupert und Harm 1971), aber wie anschließend gezeigt wird (in 3.3.4.), ist das Dose-Decrement vom Dunkelreparaturvermögen des Stammes abhängig.

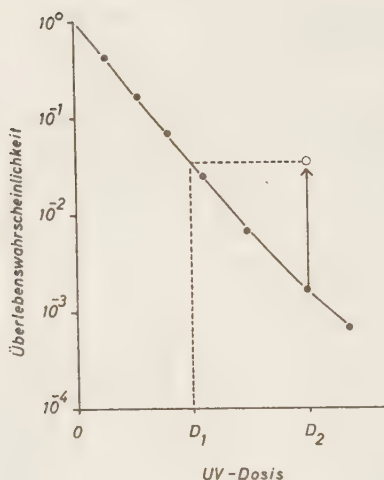


Abb. 22 Schematische Darstellung des Dose-Decrements. Wenn die Überlebenswahrscheinlichkeit durch PhR erhöht wird, heißt die Differenz zwischen der applizierten UV-Dosis (D_2 in der Abb.) und der UV-Dosis, die eine gleiche Überlebensrate wie nach D_2 + PhR besitzt (D_1 in der Abb.), das Dose-Decrement bei UV-Dosis D_2 .

In Abb. 23 ist das Dose-Decrement (das formale Dose-Decrement) für die beiden haploiden Stämme dargestellt. Das Dose-Decrement des Stammes MB 1030-1A erreicht einen maximalen Wert von $6.2 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$, nachdem UV-Dosen von mehr als 1.5 J/m^2 appliziert worden sind. Beim Stamm S24-12c wurde

ein maximales Dose-Decrement von $8.5 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ erreicht, wenn die UV-Dosis größer als 6 J/m^2 war. Abb. 24 zeigt das Dose-Decrement der beiden diploiden Stämme in Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis. Stamm 2217 erfordert eine UV-Dosis von 4.5 J/m^2 , um ein maximales Dose-Decrement von $7.8 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ zu erreichen, während für Stamm S 2094 fast 10 J/m^2 nötig sind, um ein maximales Dose-Decrement von $9.5 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ zu ergeben.

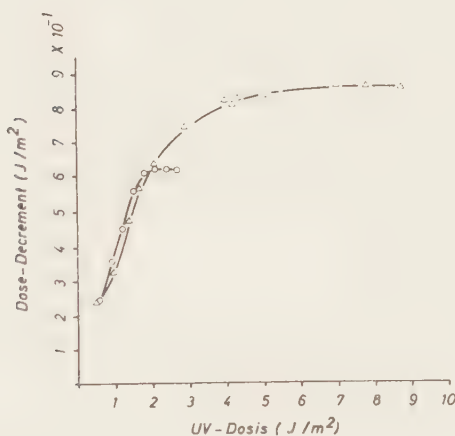


Abb. 23 UV-Dosis-Abhängigkeit des Dose-Decrements (Dosis-Verringerung) erzielt durch PhR durch einen Lichtblitz (Blitz-PhR) nach maximaler Komplexbildung bei den haploiden Stämmen MB 1030-1A (○) und S24-12c (△).

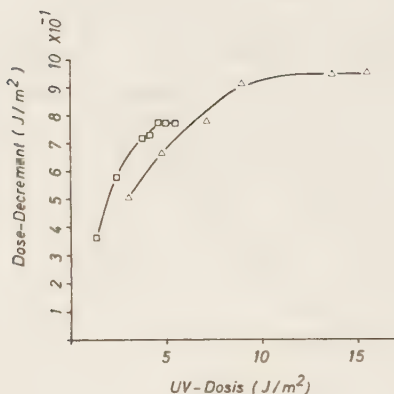


Abb. 24 UV-Dosis-Abhängigkeit des Dose-Decrements bei den diploiden Stämmen 2217 ($\square$) und S2094 ($\triangle$).

3.3.4. Die Modifikation des Dose-Decrements durch nicht-photoreaktivierbare Schäden

Durch UV-Bestrahlung entstehen außer photoreaktivierbaren Schäden auch nicht photoreaktivierbare Schäden, die etwa 10 % - 15 % der gesamten UV-induzierten DNS-Schäden in *E. coli* DNS betragen (Setlow und Setlow 1963, Setlow, R.B. 1964, Setlow, J.K. 1967). Genaue Kenntnisse über die Natur dieser nichtphotoreaktivierbaren Schäden existieren zur Zeit noch nicht. Vermutet wird, daß es sich entweder um Pyrimidindimere handelt, die wegen der Nachbarschaft bestimmter Basensequenzen oder aus anderen Gründen nicht reparierbar sind, oder daß es sich um andere Typen von UV-Schäden (Strangbrüche, die zu Vernetzungen führen können) handelt. Es ist noch nicht bekannt, wieviel Prozent der ge-

samten UV-induzierten DNS-Schäden bei *Saccharomyces* nicht-photoreaktivierbar sind (siehe Diskussion).

Die Zunahme der photoreaktivierbaren und nichtphotoreaktivierbaren Schäden in der DNS einer Zelle mit zunehmender UV-Dosis ist schematisch in Abb. 25 aufgezeichnet. Die Anzahl der photoreaktivierbaren Schäden pro DNS nach einer UV-Bestrahlung mit der Dosis U_2 ist durch N_1 gegeben. Durch Photoreaktivierung nimmt N_1 auf N_2 ab. Das Dose-Decrement $U_2 - U_1$ könnte aus der Überlebenswahrscheinlichkeitskurve bestimmt werden, wenn die mit der UV-Dosis U_2 bestrahlt und anschließend photoreaktivierten Zellen und die mit U_1 bestrahlten Zellen wirklich die gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit hätten. Wegen der Zunahme von nichtphotoreaktivierbaren Schäden mit zunehmender UV-Dosis, können aber unterschiedlich viele nichtphotoreaktivierbare Schäden (N_3 und N_4 in Abb. 25) gebildet werden. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Bestrahlung mit der UV-Dosis U_1 ohne PhR kann höher als die nach U_2 plus PhR liegen, weil die Zellen durchschnittlich $N_4 - N_3$ weniger nichtphotoreaktivierbare Schäden haben, als Zellen, die mit U_2 bestrahlt und photoreaktiviert worden sind. Unter der Voraussetzung, daß die Anzahl der photoreaktivierbaren und nichtphotoreaktivierbaren Schäden geradlinig mit zunehmender UV-Dosis zunimmt und weiteren später noch zu erwähnenden plausiblen Annahmen, kann die Berechnung des wirksamen Dose-Decrements ($U_2 - U_1$) aus der Überlebenswahrscheinlichkeit auf folgende Weise durchgeführt werden.

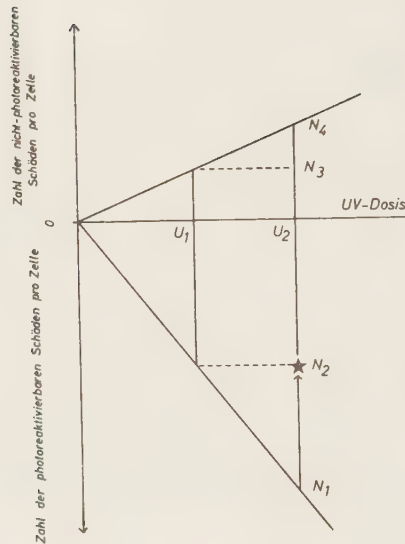


Abb. 25 Schematische Darstellung der Zahl der photoreaktivierbaren und nichtphotoreaktivierbaren Schäden in einer Zelle nach UV-Bestrahlung mit der Dosis U_2 , durch die N_4 nicht- und N_1 photoreaktivierbare Schäden erzeugt werden. Durch PhR (z.B. "Blitz-PhR") verringert sich die Zahl der photoreaktivierbaren Schäden auf N_2 .

Werden Zellen mit der UV-Dosis $U_2 - U_1$ bestrahlt, dann maximal photoreaktiviert und anschließend mit der UV-Dosis U_1 wieder bestrahlt, so wird die Überlebenswahrscheinlichkeit derjenigen gleichen, die durch UV-Bestrahlung mit der Dosis U_2 plus Photoreaktivierung durch einen Lichtblitz (wenn N_2 durch einen Lichtblitz erreicht wird) erreicht

werden kann. Zur experimentellen Bestimmung der Dosis $U_2 - U_1$ (wirksames Dose-Decrement) werden Zellen zuerst mit einer UV-Dosis U bestrahlt und anschließend sofort maximal photoreaktiviert. Nach maximaler PhR werden die Zellen sofort wieder mit der UV-Dosis $U_2 - U$ bestrahlt. Durch Variation von U , kann diejenige UV-Dosis bestimmt werden, durch die eine gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit wie nach Applikation der UV-Dosis plus PhR mit einem Lichtblitz erreicht wird. Diese Dosis repräsentiert den echten Dosis-Unterschied $U_2 - U_1$, der zur Bestimmung der Anzahl der PRE-Moleküle nötig ist. Eine geradlinige Zunahme der Pyrimidindimere mit zunehmender UV-Dosis wurde bei haploiden und diploiden *Saccharomyces* Zellen beobachtet (Waters und Moustacchi 1975). Es gibt bisher keine Gründe, daß eine geradlinige Zunahme nichtphotoreaktivierbarer Schäden auszuschließen wäre.

Außer der bereits erwähnten Annahme einer linearen Zunahme von photoreaktivierbaren und nichtphotoreaktivierbaren Schäden mit zunehmender UV-Dosis müssen noch folgende Voraussetzungen und experimentelle Bedingungen erfüllt sein, um diese Überlegung zur Bestimmung des Dose-Decrements erfüllen zu können.

1). Die Zeitdauer zwischen Vor- und Nachbestrahlung mit UV, während der maximale PhR stattfindet, muß so gewählt sein, daß die Fraktionierung der UV-Bestrahlung keinen Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ausübt. Auswirkungen einer Fraktionierung der UV-Dosis müssen daher bei den verwendeten Stämmen überprüft werden.

2). Die maximale PhR zwischen beiden UV-Bestrahlungen (Vor- und Nachbestrahlung) verursacht keine anderen Effekte als die Reparatur aller vorhandener photoreaktivierbaren Schäden. Es tritt kein 'Photoprotection'-Effekt auf, bei dem durch Vorbestrahlung mit langwelligem UV-Licht die Überlebenswahrscheinlichkeit nach anschließender UV-Bestrahlung erhöht werden kann (Jagger et al. 1964). Um diesen Effekt zu vermeiden, muß ein Lichtfilter bei der maximalen PhR

benutzt werden, der das langwellige UV-Licht herausfiltert.

3.3.5. Die Bestimmung des modifizierten Dose-Decrements beim haploiden und diploiden Stamm

Um das modifizierte Dose-Decrement zu bestimmen, muß zunächst überprüft werden, ob die Spaltung einer UV-Dosis in zwei Teile, die in zeitlichem Abstand von 60 min. appliziert werden, die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflusst, und ob eine Vorbestrahlung mit dem PhR-Licht, dessen Wellenlänge länger als 390 nm ist (siehe S. 8), die UV-DEK ändert.

Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der Dosisfraktionierung für die haploiden Stämme MB 1030-1A und S24-12c. Sie zeigen keine Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb von 30 Min. und eine sehr leichte Abnahme bei einem Zeitintervall von 60 Min. bei dem resistenteren Stamm S24-12c. In Abb. 27 zeigt sich der gleiche Effekt der Dosisaufspaltung für die diploiden Stämme 2217 und S2094. Während 2217 keine Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Dosisfraktionierung bis zu Zeitintervallen von 60 Min. zeigte, nimmt die Überlebenswahrscheinlichkeit von Stamm S2094 durch die Dosisfraktionierung schon bei Zeitintervallen von 15 Min. und mehr deutlich ab und liegt bei 60 Min. unter 50 % von der Überlebenswahrscheinlichkeit ohne Fraktionierung der UV-Dosis.

UV-DEK und UV-DEK nach 30 Min. langer Vorbestrahlung mit PhR-Licht sind in Abb. 28 für Stamm MB 1030-1A, in Abb. 29 für Stamm S24-12c und in Abb. 30 für Stamm 2217 dargestellt. Da beim Stamm S2094 die Intensität des hier verwendeten PhR-Lichts nicht ausreicht, maximale PhR innerhalb 15 Min. zu erreichen, wurde der Stamm nicht weiter untersucht. Die Benutzung noch intensiveren PhR-Lichtes kann es ermöglichen, das modifizierte Dose-Decrement auch dieses Stammes zu bestimmen. Die Abb. 28 und Abb. 29 zeigen, daß sich jeweils

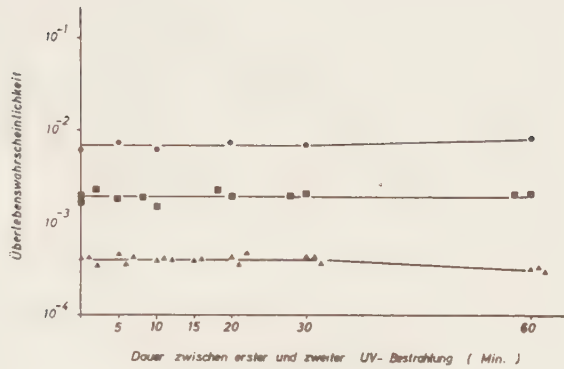


Abb. 26 Effekt der Dosisfraktionierung in zwei Teile, Stamm MB 1030-1A ($5.4 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ plus $5.4 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ ● und 1.08 J/m^2 plus $3.6 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ ■), und Stamm S24-12c (1.44 J/m^2 plus 7.92 J/m^2 ▲)

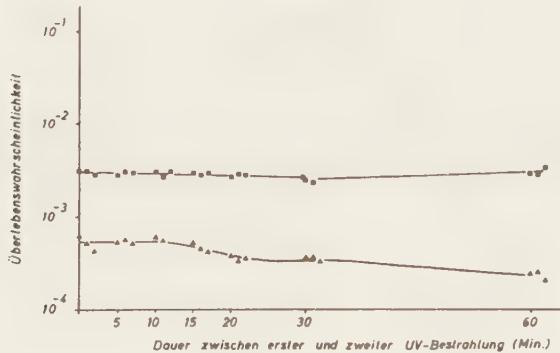


Abb. 27 Effekt der Dosisfraktionierung in zwei Teile, Stamm 2217 (■) 1.44 J/m^2 plus 2.52 J/m^2 Stamm S2094 (▲) 1.44 J/m^2 plus 10.8 J/m^2

die zwei DEK der Stämme MB 1030-1A und S24-12c decken. Demgegenüber liegt die mit etwas intensiverem PhR-Licht (etwa 50 % mehr Intensität als bei der PhR der beiden haploiden Stämme) vorbestrahlte DEK des Stammes 2217 mit zunehmender UV-Dosis höher als die DEK ohne Vorbestrahlung mit PhR-Licht.

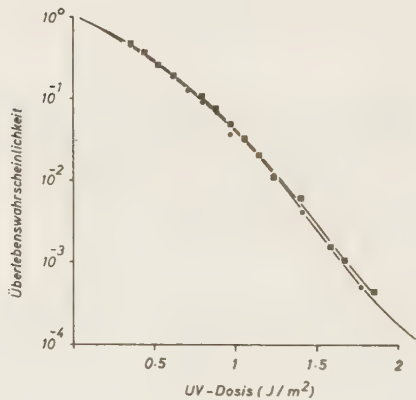


Abb. 28 DEK von Stamm MB 1030-1A mit Vorbestrahlung mit PhR-Licht (■) und ohne Vorbestrahlung (●)

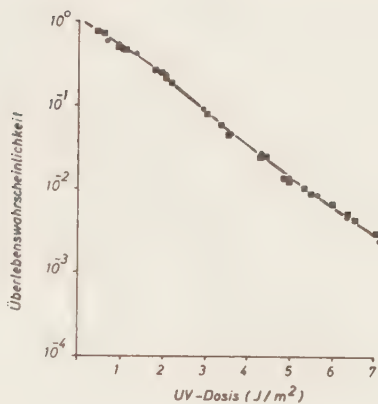


Abb. 29 DEK von Stamm S24-12c mit Vorbestrahlung mit PhR-Licht (■) und ohne Vorbestrahlung (●).

Abb. 30
DEK von Stamm 2217
nach Vorbestrahlung
mit PhR-Licht (■)
und ohne Vorbe-
strahlung (●)

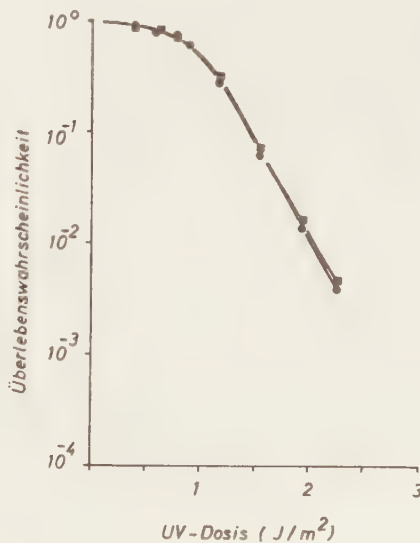


Abb. 31 zeigt die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit mit zunehmender Dosis der Vorbestrahlung vor der maximalen PhR für Stamm MB 1030-1A. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Stamm S24-12c und Stamm 2217 erhalten. Wie in 3.3.4. beschrieben, wurde die UV-Dosis der Vorbestrahlung als das modifizierte Dose-Decrement bestimmt, wenn die Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Nachbestrahlung gleich ist mit der durch einen Blitz nach UV-Bestrahlung mit einer Dosis, die mit der gesamten UV-Dosis (Vor- und Nachbestrahlung) identisch ist (siehe 3.3.4.). Die lineare Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit mit zunehmender Vorbestrahlungsdosis bei gleicher gesamter UV-Dosis bedeutet, daß die Vorbestrahlungsdosis, die dem gesuchten Dose-Decrement entspricht, eindeutig aus der Überlebenswahrscheinlichkeit bestimmt werden kann.

Abb. 31

UV-Dosis (Vorbestrahlung)-Abhängigkeit von Überlebenswahrscheinlichkeit bei gleichen gesamten UV-Dosen von 0.68 J/m^2 ($\bullet$), 0.85 J/m^2 ($\blacktriangle$), 1.00 J/m^2 ($\blacksquare$), 1.30 J/m^2 ($\circ$), 1.5 J/m^2 ($\triangle$) und 1.7 J/m^2 ($\square$) (Stamm MB 1030-1A). Die vorbestrahlten Zellen wurden bis zur maximalen Überlebenswahrscheinlichkeit photoreaktiviert und anschließend nachbestrahlt.

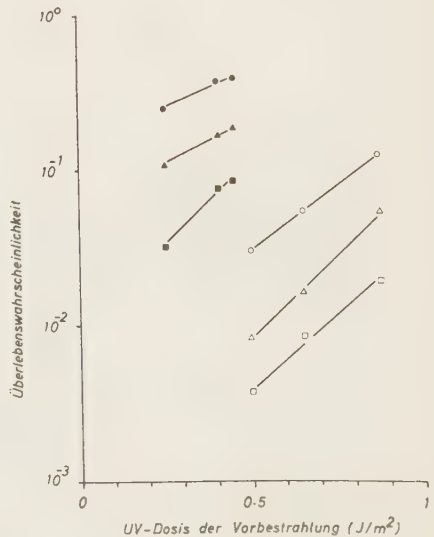


Abb. 32 zeigt die Dose-Decremente beider haploider Stämme, die aus Abb. 23 übernommen worden sind, und die modifizierten Dose-Decremente beider Stämme. Nach der Modifizierung zeigen die maximalen Dose-Decremente beider Stämme gleiche Werte von 1.1 J/m^2 . Beim diploiden Stamm 2217 ist die Zunahme des Dose-Decrements durch die Modifizierung kleiner als die beider haploider Stämme und erreicht einen maximalen Wert von 0.9 J/m^2 (Abb.33). Die bei Stamm MB 1030-1A größere Zunahme des Dose-Decrements durch Modifizierung als bei den anderen Stämmen kann durch eine kleinere Reparaturkapazität der nichtphotoreaktivierbaren Schäden bei MB 1030-1A erklärt werden. Abb. 34 zeigt DEken und maximale PhR der drei Stämme. Während bei den Stämmen S24-12c und 2217 durch maximale PhR eine hohe Überlebenswahrscheinlichkeit erreicht werden kann, zeigt Stamm MB 1030-1A nach maximaler PhR einen noch relativ niedrige Überlebenswahrscheinlichkeit.

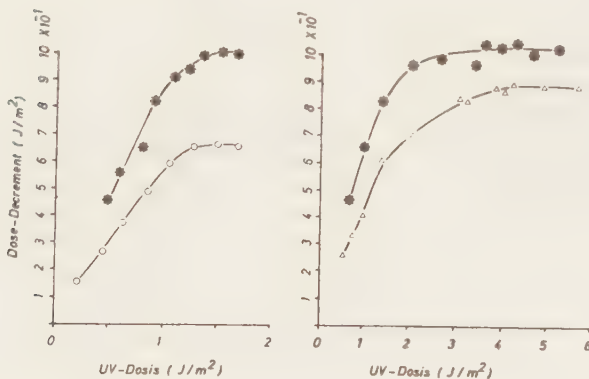


Abb. 32 Dose-Decrement für Stamm MB1030-1A (O) und für Stamm S24-12c (Δ) und ihre modifizierten Dose-Decremente (*).

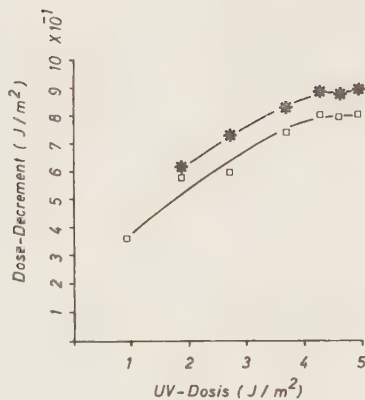
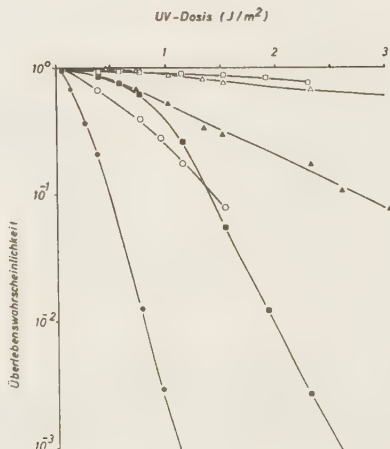


Abb. 33 Dose-Decrement (□) und modifiziertes Dose-Decrement (*) für Stamm 2217

Abb. 34

DEK von MB 1030-1A (●), S24-12c (▲) und 2217 (■), und maximale PhR von MB 1030-1A (○), S24-12c (△) und 2217 (□).



In der Abb. 35 wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit nach maximaler PhR nach UV-Bestrahlung nicht gegenüber der UV-Dosis sondern gegenüber der Überlebenswahrscheinlichkeit ohne PhR nach der UV-Bestrahlung aufgetragen. Da eine Überlebenswahrscheinlichkeit nach UV-Bestrahlung ohne PhR der Anzahl der durch Dunkelreparatur nicht reparierten letalen Schäden (photoreaktivierbare und nichtphotoreaktivierbare Schäden) in der bestrahlten Zelle (also in DNS) entspricht, zeigen die Überlebenswahrscheinlichkeiten nach maximaler PhR der verschiedenen Stämme das unterschiedliche Dunkelreparaturvermögen der Stämme bei der Reparatur nichtphotoreaktivierbarer Schäden. MB 1030-1A zeigt deutlich das niedrigste Dunkelreparaturvermögen bei der Reparatur nichtphotoreaktivierbarer Schäden in den drei Stämmen (Abb. 35). In 4.1. wird das Verhältnis zwischen nichtphotoreaktivierbaren Schäden und Dunkelreparaturvermögen von MB 1030-1A und S24-12c quantitativ diskutiert.

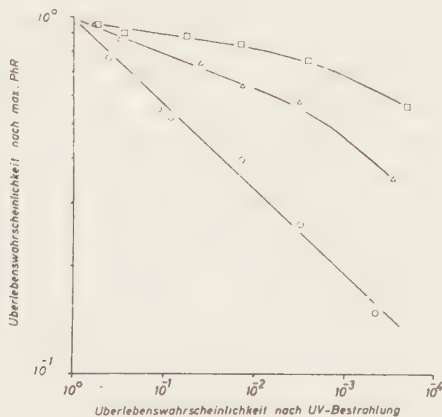


Abb. 35 Überlebenswahrscheinlichkeit nach maximaler PhR in Abhängigkeit von der Überlebenswahrscheinlichkeit ohne PhR nach UV-Bestrahlung. MB 1030-1A (○), S24-12c (△), und 2217 (□).

3.3.6. Die Bestimmung der Anzahl der PRE-Moleküle in Saccharomyces Zellen verschiedener Stämme

Wie in Abb. 32 gezeigt wird, zeigen die modifizierten Dose-Decrements der haploiden Stämme MB 1030-1A und S24-12c die gleichen maximalen Werte von 1.1 J/m^2 . Trotz weiterer Zunahme der UV-Schäden erfolgt keine Zunahme des Dose-Decrements. In diesem Falle muß die Zahl der vorhandenen ES-Komplexe identisch sein mit der Anzahl der PRE-Moleküle im Kern. Die Anzahl der PRE-Moleküle kann nun mit Hilfe des modifizierten Dose-Decrements berechnet werden, wenn die Zahl der pro J/m^2 produzierten Pyrimidindimere bekannt ist (Harm et al. 1971). Unrau et al. (1973) haben 24 Dimere pro haploides Genom pro erg mm^{-2} ($240 \text{ Dimere pro J/m}^2$) gefunden. Ein Wert, der durch die Markierung mit ^{14}C und Reinigung der DNS von RNS erhalten worden ist. Fäth und Brendel (1975) haben 320 ± 30 Dimere pro haploides Genom pro J/m^2 in jüngst isolierten für Desoxythymidinmonophosphat auxotrophen Saccharomyces Mutanten gefunden. Multipliziert man diesen Wert mit dem modifizierten Dose-Decrement von 1.1 J/m^2 für die Stämme MB 1030-1A und S24-12c, ergibt sich eine Anzahl von 350 ± 40 PRE-Molekülen pro haploide Zelle. Wenn der mittlere Fehler bei der Bestimmung des modifizierten Dose-Decrements berücksichtigt wird, ergibt sich ein Wert von 350 ± 80 PRE-Molekülen, die die Photoreparatur nuklearer DNS-Schäden bewirken, pro haploide Zelle. Durch genauere Messung der UV-Dosis-Rate sind diese Werte etwa 20 % größer als diejenigen, die früher veröffentlicht worden sind (Yasui und Laskowski 1975). Wird das modifizierte Dose-Decrement des diploiden Stammes 2217 mit 0.9 J/m^2 verwendet, und angenommen, daß 640 ± 60 Dimere pro diploides Genom pro J/m^2 produziert werden⁽¹⁾, so ergibt sich eine Anzahl von 580 ± 110

(1) Eine Verdopplung der Zahl der pro J/m^2 produzierten Pyrimidindimere wurde bei diploiden Zellen beobachtet (Waters und Moustacchi 1975).

PRE-Molekülen, die für die Photoreparatur nuklearer DNS-Schäden verantwortlich sind, pro diploide Zelle.

3.3.7. Der Komplexbildungsfaktor in haploiden und diploiden Zellen und seine Temperaturabhängigkeit nach UV-Bestrahlung

Nach dem Reaktionsschema Gleichung (1) auf S. 1 muß die Bildung der Enzym-Substrat (ES) -Komplexe im Dunkel nach UV-Bestrahlung nach folgender Differentialgleichung ablaufen:

$$(d[ES] / dt) = k_1 [E] [S] - k_2 [ES] \quad (2)$$

Hier bedeutet $[ES]$ die Konzentration des ES-Komplexes, $[E]$ des freien Enzyms und $[S]$ des freien Substrates. k_1 ist die Reaktionskonstante für die Komplexbildung und k_2 für die Dissoziation des Komplexes im Dunkel.

k_1 kann auf folgende Weise in vivo bestimmt werden (Harm et al. 1971). Direkt nach der UV-Bestrahlung werden die bestrahlten Zellen unter PhR-Licht gebracht und während einer bestimmten Zeitdauer so photoreaktiviert, daß alle immer neu gebildeten ES-Komplexe sofort gespalten werden können. Entsprechend Gl.(2) wird sich damit die Konzentration des freien Enzyms der Anzahl der Enzymmoleküle $[E]_n$ nähern. Da $[ES]$ während der PhR klein bleibt und k_2 nicht groß ist (Ergebnis aus in vitro Experimenten, Harm et al. 1971), kann das zweite Glied in G. (2) vernachlässigt werden. Also

$$(d[ES] / dt) = k_1 [E]_n [S] \quad (3)$$

$d[ES]$ in dieser Gl. (3) kann durch $-d[S]$ ersetzt werden, denn die Bildung eines ES-Komplexes führt unter diesen Bedingungen zur sofortigen Aufspaltung und bedeutet daher die Abnahme eines Substrates. Dann ist

$$(d[S] / dt) = -k_1 [E]_n [S] \quad (4a)$$

Diese Gleichung entspricht der folgenden Gleichung.

$$\ln ([S]_t / [S]_0) = -k_1 [E]_n t \quad (4b)$$

Hier ist t die Zeit nach der UV-Bestrahlung, $[S]_t$ ist die Anzahl des Substrates zur Zeit t und $[S]_0$ zur Zeit 0. Da $[S]_t / [S]_0$ experimentell durch $[1 - (\text{Dose-Decrement durch PhR nach der Zeit } t / \text{maximale Dose-Decrement})]$ bestimmt werden kann, und $[E]_n$, die Zahl der PRE-Moleküle, schon bekannt ist, kann k_1 berechnet werden.

Um eine möglichst schnelle Aufspaltung der Komplexe zu bekommen, wurde eine Xenon-Hochdrucklampe verwendet (siehe 2.5.1.). Mit dem Quantenflußmesser und mit UV bestrahlten Zellen wurde gezeigt, daß die Abnahme des Abstandes zwischen der Lampe und der mit UV bestrahlten Suspension keine erkennbare Zunahme des PhRseffektes bringt, wenn der Abstand kleiner als 12 cm wird, obwohl die Zahl der Photonen zunimmt. Das bedeutet, daß die Zahl der photoreaktivierbaren Photonen beim Abstand von 12 cm schon so groß ist, daß alle neu gebildeten Komplexe sofort aufgespalten werden können. Die Zellsuspensionen in Plastikschrälchen, die fast 100 prozentig PhR-Licht durchlassen, wurden von oben aus mit UV und von unten aus mit PhR-Licht bestrahlt. Kurz vor der UV-Bestrahlung wurde eine Zellsuspension auf den Filter gelegt, der von unten aus Photonen mit einer Wellenlänge $> 345 \text{ nm}$ durchläßt. Die UV-Bestrahlungsdauer war immer eine Sekunde, damit die Komplexbildung während der UV-Bestrahlung klein bleibt. Der Abstand zwischen UV-Lampe und Suspension wurde so variiert, daß nach einer UV-Bestrahlungszeit von 1s die Überlebenswahrscheinlichkeit etwa 10^{-4} war. Der Anfang der Bestrahlungszeit mit der Xenon-Lampe (PhR) wurde jeweils 0.5 s nach Öffnen der UV-Blende (Mitte der UV-Bestrahlung) festgesetzt (Zeit 0 in Abb 36). Von diesem Zeitpunkt an gelten die PhR-Zeiten.

Abb. 36 zeigt die Abnahme des Quotienten aus der Zahl der noch nicht photoreaktivierten photoreaktivierbaren Schäden und der Zahl der photoreaktivierbaren Schäden vor der PhR durch die Xenon-Lampe beim haploiden und diploiden Stamm bei verschiedenen Suspensionstemperaturen. Bei Zimmertemperatur 22 C wurde bis 30 s nach UV-Bestrahlung gemessen. Das Bild zeigt eine plötzliche Abnahme der Neigung 15 s nach UV-Bestrahlung. Diese Abnahme wurde wahrscheinlich durch die Steigerung der Suspensionstemperatur verursacht, die zu einer schnelleren Verringerung der photoreaktivierbaren Schäden infolge einer schnelleren Komplexbildung führen sollte. Obwohl die Suspension während der PhR mit Xenon-Lampe immer durch Luftzirkulation gekühlt wurde, ließ sich eine Erhöhung der Suspensionstemperatur nicht vermeiden. k_1 -Werte innerhalb von 10 s nach UV-Bestrahlung des haploiden und diploiden Stammes werden in Tabelle 3 angegeben.

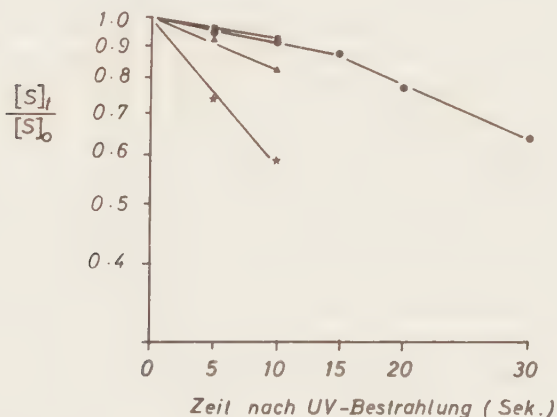


Abb. 36 Abnahme der Substrate (photoreaktivierbare Schäden) mit PhR nach Bildung des Schadens bei Stamm MB 1030-1A

bei 10 C (■), bei 22 C (●) und bei 40 C (▲) und Stamm 2217 bei 22 C (★). $[S]_t$ ist die Angabe des Substrates zur Zeit t und $[S]_0$ zur Zeit 0 unter PhR-Licht zur Spaltung aller Komplexe bei genügender Intensität.

Tabelle 3 Temperaturabhängigkeit des Komplexbildungsfaktors

Stamm	Temperatur	k_1 (Zell-Volumen Molekül. s ⁻¹)
MB 1030-1A (Haplont)	10 C	2.55×10^{-5}
	22 C	3.12×10^{-5}
	40 C	5.81×10^{-5}
2217 (Diplont)	22 C	8.52×10^{-5}

Es ist auffällig, daß die k_1 -Werte diploider Zellen mehr als doppelt so groß wie die k_1 -Werte haploider Zellen bei Zimmertemperatur 22 C sind. In Abb. 34 wurden die k_1 -Werte mit den bei *E. coli* erhaltenen Werten verglichen (Harm, W. 1970). Bei Zimmertemperatur von 22 C beträgt k_1 haploider *Saccharomyces* Zellen fast 1/50 von k_1 der *E. coli* Zellen. Die Zunahme der k_1 bei Zunahme der Suspensionstemperatur ist bei *Saccharomyces* weniger ausgeprägt als bei *E. coli*. Wie bei anderen Enzym-Substrat-Reaktion werden auch hier die Reaktionskonstanten k_1 und k_2 durch Temperatur und Ionenstärke beeinflusst (Harm 1970, H. Harm und Rupert ;970, Cook und Procter 1974). Aus der Temperaturabhängigkeit von k_1 , die in Abb. 37 geradlinig zu $1/T$ gezeigt wird, kann die Aktivierungsenergie E_A aus der Arrhenius-Gleichung $k_1 = A_1 \exp (- E_A / RT)$ bestimmt werden (R ist die Gaskonstante, die 1.986 cal. Grad⁻¹. Mol⁻¹ beträgt, und A_1 ist eine Konstante). Die Neigung der Linie in Abb. 37 ergibt als Aktivitätsenergie bei der Komplexbildung im *Saccharomyces*-System einen Wert von 5.33 kcal Mol. Dieser Wert beträgt fast die Hälfte des beim *E. coli* System erhaltenen Wertes, der mit 11 kcal. Mol angegeben wird (Harm et al. 1970).

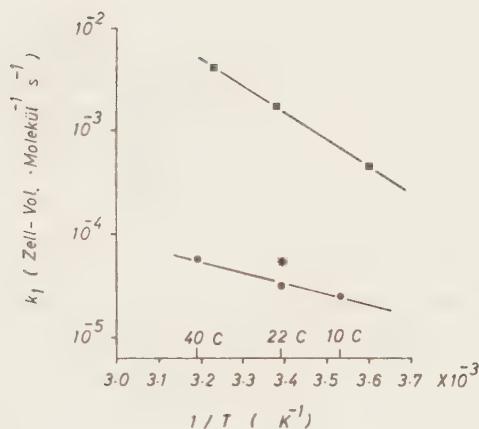


Abb. 37 Temperaturabhängigkeit des Komplexbildungsfaktors k_1 beim haploiden *Saccharomyces* Stamm (●) und bei *E. coli* (■) (Harm und Rupert 1970). * zeigt k_1 des diploiden *Saccharomyces* Stammes bei 22 C.

Wenn die nach maximaler Komplexbildung mit einem Lichtblitz photoreaktivierten Zellen sofort dem intensiven PhR-Licht ausgesetzt werden, kann die Komplexbildung zwischen gerade von Komplexen frei gewordenen PRE-Molekülen und Substraten beobachtet werden. Als Anfang der Bestrahlungsdauer mit der Xenon-Lampe wurde stets ein Zeitpunkt von 0.5 s nach Öffnen der UV-Blende (Mitte der Bestrahlungszeit) genommen. Bei Zimmertemperatur war der Komplexbildungsfaktor k_1 1.43×10^{-5} Zellvolumen Molekül s^{-1} 5 Sekunden nach der Applikation eines Blitzes und 2.5×10^{-5} 10 Sekunden nach einer Blitzapplikation. Diese Werte sind noch kleiner als die k_1 -Werte, die direkt nach UV-Bestrahlung erhalten wurden.

3.3.8. Die Veränderung der Photoreaktivität mit der Zeit nach UV-Bestrahlung

Wie in 3.3.1. beschrieben wurde, nimmt die Zahl nach UV-Bestrahlung zu, bis 15-20 Minuten nach UV-Bestrahlung ein Maximum erreicht wird. Wie bei Stamm 2217 in Abb. 37 zu beobachten ist, nimmt aber die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch PhR mit einmaligem Lichtblitz bei Zeitintervallen von mehr als 20 Minuten zwischen UV-Bestrahlung und Lichtblitz wieder ab. Abb. 38 zeigt eine ähnlich langsame Abnahme der Blitz-PhR sowie eine noch langsamere Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeit UV-bestrahlter und UV-bestrahlter plus nach verschiedenen Zeiten mit einem Lichtblitz photoreaktivierten Zellen von Stamm MB 1030-1A, der bis zu 4 Stunden nach UV-Bestrahlung in Puffer aufbewahrt wurde. Unabhängig davon, wann innerhalb von 30 Minuten nach UV-Bestrahlung mit einem Lichtblitz photoreaktiviert wurde, nehmen alle Überlebenswahrscheinlichkeiten gleichmäßig langsam mit der Zeitdauer der Pufferhaltung ab. Die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch einen Lichtblitz beginnt bei Stamm MB 1030-1A etwa 2 Stunden nach UV-Bestrahlung abzunehmen.

Weitere Effekte durch Pufferhaltung und Blitz-PhR sind in folgenden Abb. 39, Abb. 40 und Abb. 41 zu sehen. Die mit UV bestrahlten Zellen und die UV-bestrahlten plus mit einem Lichtblitz nach maximaler Komplexbildung photoreaktivierten Zellen wurden in Puffer im Dunkeln gehalten. Kontrollzellen wurden auch im Puffer gehalten und alle Werte von UV-bestrahlten Zellen wurden auf die Überlebenden der Kontrollzellen bezogen, deren Lebensfähigkeit durch Pufferhaltung jeden Tag um fast 10 % abnahm. Die Pufferhaltung verringert die Überlebenswahrscheinlichkeit der mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlten Zellen. Dieser sog. "Negative-Liquid-Holding-Recovery" (Parry 1972) -Effekt ist charakteristisch für Stamm MB 1030-1A. Nur die Überlebenswahrscheinlichkeit der mit 1.5 J/m^2 bestrahlten Zellen nimmt 3 Tage nach

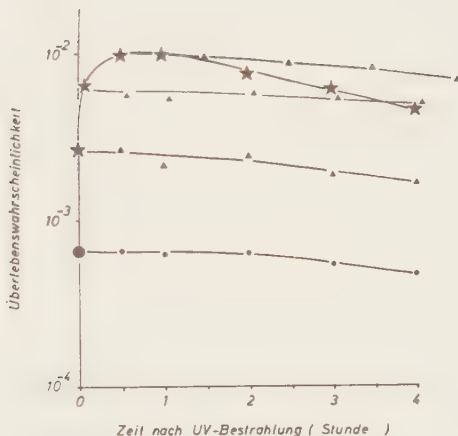


Abb. 38 Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung (●). Blitz-PhR 30 s, 5 Min., 30 Min., 1 Std., 2 Std., 3 Std. und 4 Std. nach der UV-Bestrahlung (★). Die mit Blitz 30 s., 5 Min. und 30 Min. nach UV-Bestrahlung photoreaktivierte Zellen wurden weiter im Puffer gehalten (▲).

UV-Bestrahlung wieder zu und erreicht 6 Tage nach UV-Bestrahlung fast die gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit, wie am ersten Tag. Eine gleiche Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen Zellen, die 40 Minuten nach UV-Bestrahlung, also bei maximaler Komplexbildung, mit einem Lichtblitz photoreaktiviert worden sind. Zwei Linien der Puffer-Haltung in den drei Abbildungen laufen fast parallel miteinander. Blitz-PhR und maximale PhR der Zellen, die nach UV-Bestrahlung in Puffer im Dunkel gehalten worden sind, zeigen aber eine ständige Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Blitz und maximaler PhR ab 2 Tagen nach UV-Bestrahlung fast unverändert bleiben.

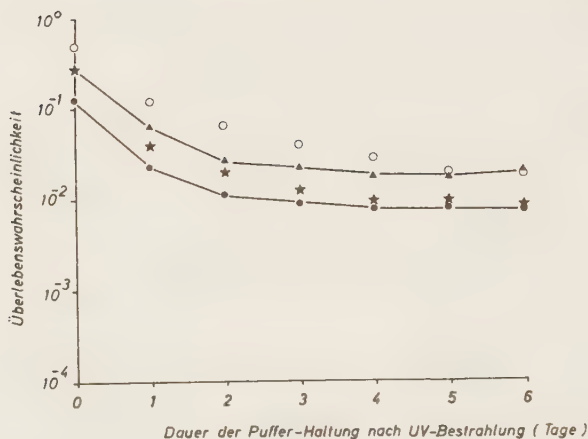


Abb. 39

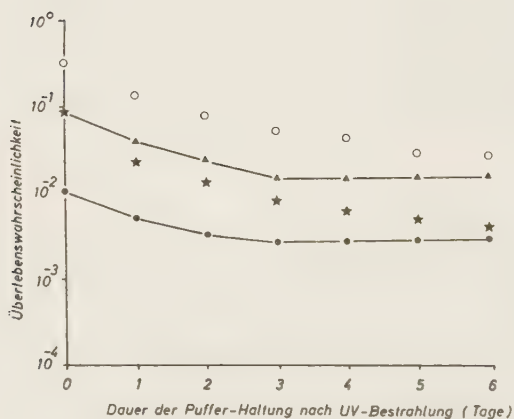


Abb. 40

Abb. 39., 40 Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung (●) mit einer Dosis von 0.5 J/m^2 (Abb. 39) und 1.0 J/m^2 (Abb. 40), nach PhR mit einem Blitz nach UV-Bestrahlung (★) und Puffer-Haltung nach der Blitz-PhR 40 Min. nach UV-Bestrahlung (▲) und maximale PhR (○).

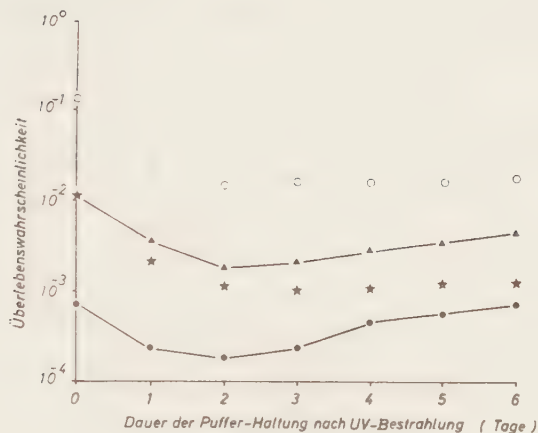


Abb. 41 Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung (●) mit einer Dosis von 1.5 J/m^2 , nach PhR mit einem Blitz nach UV-Bestrahlung (★) und Puffer-Haltung nach der Blitz-PhR 40 Min. nach UV-Bestrahlung (▲), und maximale PhR (○).

Um den Anteil der durch einen Lichtblitz photoreaktivierten Schäden unter den gesamten Schäden zu bestimmen, wurde das Verhältnis von der Zunahme durch eine Blitz-PhR zur Zunahme durch maximale PhR in halblogarithmischem Raster aufgetragen und "relatives Dose-Decrement" genannt (Abb. 42). Dieses relative Dose-Decrement entspricht dem Verhältnis, wie viel Prozent der gesamten photoreaktivierbaren Schäden durch einen Blitz repariert werden können. Das relative Dose-Decrement nimmt bei den mit drei unterschiedlichen UV-Dosen bestrahlten Zellen mit der Zeit der Puffer-Haltung ab und erreicht 6 Tage nach UV-Bestrahlung etwa ein Fünftel des relativen Dose-Decrement vom ersten

(Yasui und Laskowski 1975). Das bedeutet, daß die Zahl der durch einen Lichtblitz photoreaktivierbaren Schäden schneller abnimmt als die Zahl der gesamten photoreaktivierbaren Schäden.

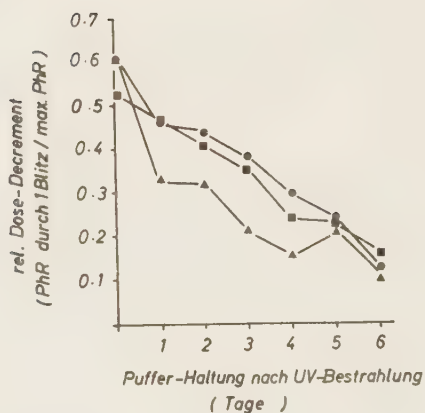


Abb. 42 Das relative Dose-Decrement (Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Blitz-PhR dividiert durch die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit nach maximaler PhR) in Abhängigkeit von der Dauer der Puffer-Haltung im Dunkel (▲: 0.5 J/m², ■: 1.0 J/m² und ●: 1.5 J/m²) bei Stamm MB 1030-1A.

3.4. Photoreaktivierung mit Laserblitzen

3.4.1. Inaktivierung und Photoreaktivierung durch Laserblitze

UV-bestrahlte und unbestrahlte (Kontroll) Zellen wurden mit Laserblitzen auf die Weise belichtet, die in 2.5.3. beschrieben worden ist.

Die Abtötung der Kontrollzellen durch Laserblitze von unterschiedlicher Wellenlänge wird in Tabelle 4 angegeben. Unter den für die Experimente zur Verfügung stehenden Laserstrahlen mit Wellenlängen von 306, 330, 337, 355, 370, 380, 397, 428 und 460 nm zeigten 306 nm und 337 nm Laserblitze eine erkennbare Abtötung nach 20maligem Blitzen. Daß es bei 330 nm Laserblitzen keine Abtötung gab, ist auf die sehr niedrige Intensität des Blitzes dieser Wellenlänge (etwa 0.02 % von der Intensität des 337 nm Laserblitzes) zurückzuführen. Wie anschließend gezeigt wird, gibt es mit der Wellenlänge von 337 nm auch einen F₀R₀seffekt.

Tabelle 4 Inaktivierung durch Laserbestrahlungen

(1) Wellenlänge	306 nm	337 nm
(2) gesamte Intensität der 20 Blitze	$2.8 \times 10^3 \text{ J/m}^2$	$2.3 \times 10^4 \text{ J/m}^2$
(3) Überlebenswahrscheinlichkeit von Stamm MB 1030-1A nach 20 Blitzen	9.23×10^{-1}	6.00×10^{-1}
(4) Für die Gewinnung der oben angegebenen Überlebenswahrscheinlichkeit nötige UV-Dosis bei der Bestrahlung mit 254 nm Licht	0.06 J/m^2	0.16 J/m^2
Abtötungseffektivität (4)/(2)	2.14×10^{-5}	6.9×10^{-6}

Abb. 43 zeigt die Inaktivierung von Stamm MB 1030-1A durch Laserblitzapplikation von 337 nm Laserlicht. Diese DEK hat einen deutlichen Schwanz. Dieser Schwanz kann durch gleichzeitigen PhRseffekt und eventuelle Inaktivierungssättigung verursacht werden. Der Inaktivierungssättigungseffekt kann passieren, wenn ein Teil der gesamten Zellpopulation stark inaktiviert wird. Da der Durchmesser des 337 nm-Strahles klein ist (1.8 mm), könnte der Sättigungseffekt auftreten. Abb. 44 zeigt die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit mit zunehmender Anzahl der Laserblitze mit Wellenlängen von 460 nm oder 367 nm. Das Zeitintervall zwischen 2 Blitzen betrug jeweils 30 Sekunden. Gleichzeitig wird in der gleichen Abbildung die PhR mit Photoblitz gezeigt, die nach 25maligem Blitzen mit gleichem Zeitabstand schon ihr Maximum erreicht hat, während die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Laserblitze beider Wellenlängen wegen der kleineren Intensität dieser Blitze nach 150maligem Applikation noch nicht das Plateau erreicht. Wie in der Anfangsphase der Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit zu sehen ist, nimmt die Überlebenswahrscheinlichkeit bis zu 10 Blitzen etwas schneller als die Zunahme durch die folgenden Blitze zu. Dieser Effekt kann auch durch die Sättigung der PhR erklärt werden, die von dem kleinen Durchmesser des Laserstrahles verursacht werden kann. Bei der Bestimmung des Wirkungsspektrums der PhR wurden deswegen immer die Werte der PhR mit bis zu 10 Blitzen benutzt.

3.4.2. Wirkungsspektrum der PhR von *Saccharomyces* Zelle

Die Photoreaktivität eines Photons kann durch ein Produkt aus dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ und der Quantenausbeute ϕ dargestellt werden. Der Koeffizient wird durch die Regel von Beer

Abb. 43
Inaktivierungskurve
von MB 1030-1A durch
Laserblitze von 337 nm

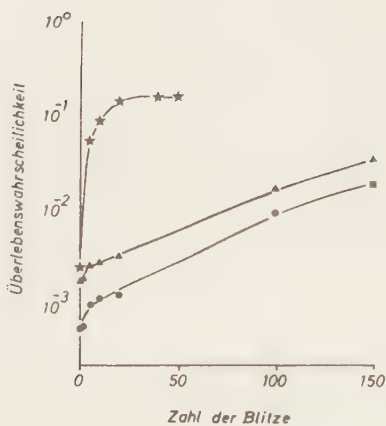
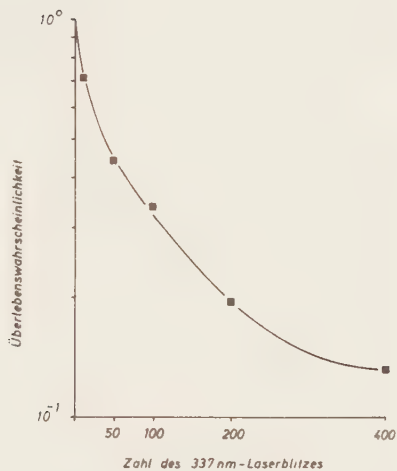


Abb. 44 Photoreaktivierung durch Photoblitzes (★) und
Laserblitze (460 nm Laserblitz ▲, 367 nm Laserblitz ●)
mit zunehmender Anzahl der Blitzapplikation.

$$\varphi = \varphi_0 \cdot 10^{-\epsilon Cx} \quad (5)$$

definiert (hier bedeuten φ_0 : Anzahl der in die Suspension, deren Länge x cm ist, eintretenden Photonen, Photonen/cm². s , C : Konzentration der Zellen als Mol/Liter, φ : Anzahl der aus der Suspension austretenden Photonen). Die Quantenausbeute ϕ ist der Quotient aus der Anzahl der photoreaktivierten Komplexe und der Anzahl der in der Zelle absorbierten Photonen. Hier wurde angenommen, daß alle PRE-Substrat-Komplexe nur durch ein Photon aufgespalten werden (Ein-Photon-Prozeß). Da ein Produkt aus photolytischer Konstante k_p und Intensität der in die Zelle eintretenden Photonen I_0 auf folgende Weise geschrieben werden kann,

$$\begin{aligned} k_p \cdot I_0 &= \varphi_0 \cdot s \cdot \phi & (s \text{ ist der Absorptionsquerschnitt der Zelle}) \\ &= 3.38 \times 10^{-21} \varphi_0 \cdot \epsilon \cdot \phi \end{aligned} \quad (6)$$

kann die Photoreaktivität eines Photons $\epsilon \cdot \phi$ aus der Gleichung

$$\begin{aligned} \epsilon \cdot \phi &[\text{Liter Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}] \\ &= k_p [\text{m}^2 \text{ J}^{-1}] \cdot \frac{5.18 \times 10^{10}}{\lambda [\text{nm}]} \end{aligned} \quad (7)$$

ermittelt werden (λ ist die Wellenlänge des Photons).

Da die Intensität eines Laserblitzes viel kleiner für die Aufspaltung von allen Komplexen ist, kann k_p von folgender Gleichung bestimmt werden.

$$k_p \cdot I_0 \quad (8)$$

$$= \ln \left[1 - \left(\frac{\text{[die Anzahl der durch einen Blitz reparierten Schäden]}}{\text{[die Anzahl der gesamten Komplexe bei der Applikation des Blitzes]}} \right) \right]$$

Die rechte Seite der Gl. (8) wurde aus experimentell erhaltenen Werten nach

$$\ln \left[1 - \left(\left[\text{das Dose-Decrement durch 10 Laserblitze} \right] / \left[10 \times \text{maximales Dose-Decrement durch einen Lichtblitz vom Elektronenblitzgerät} \right] \right) \right]$$

berechnet.

Tabelle 5 gibt die k_p -Werte und Photoreaktivität $\epsilon\phi$ der Photonen verschiedener Wellenlänge an.

Tabelle 5

Wellenlänge (nm)	k_p (m^2/J)	(Liter /Mol. cm)
357	1.03×10^{-4}	1.59×10^2
355	—	—
367	1.66×10^{-3}	2.35×10^3
370	5.32×10^{-3}	7.48×10^3
380	8.11×10^{-3}	1.11×10^4
397	1.09×10^{-2}	1.43×10^4
420	2.05×10^{-3}	2.49×10^3
460	1.21×10^{-4}	1.37×10^2

Daß es bei 355 nm Laserblitzen keine PhR gab, ist auf die sehr niedrige Intensität des Blitzes dieser Wellenlänge (etwa 8 % von der Intensität des 370 nm Laserblitzes) zurückzuführen. In Abb. 45 wurde das Wirkungsspektrum der PhR (die Photoreaktivität pro Photon von unterschiedlichen Wellenlängen) dargestellt. Zwischen 380 nm und 400 nm ist ein Wellenlängenbereich der maximalen Photoreaktivität zu sehen. In Abb. 46 wird das Wirkungsspektrum mit dem in vitro Ergebnis an Saccharomyces Extrakten (Harm und Rupert 1970) verglichen. Die maximalen Photoreaktivitäten beider Experimente sind fast gleich (etwa 1.5×10^4 Liter/Mol.cm). Im längeren Wellenlängenbereich stimmen die beiden Wirkungsspektren gut überein, aber die Kurve der in vitro

Experimente liegt im kürzeren Wellenlängenbereich viel höher als die Kurve der in vivo Versuche.

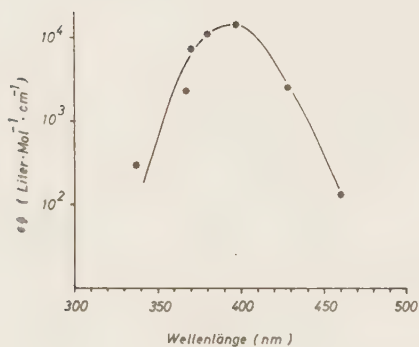


Abb. 45 Photoreaktivität eines Photons (Wirkungsspektrum der PhR in vivo)

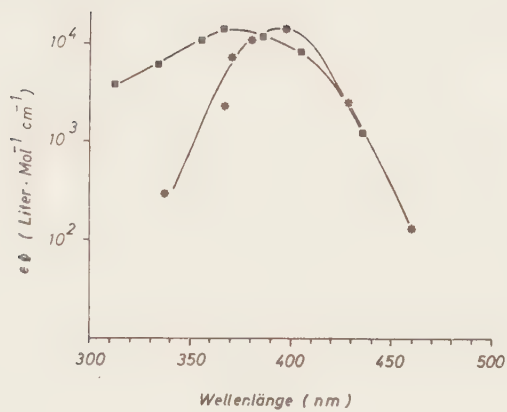


Abb. 46 Wirkungsspektrum der PhR in vivo (*) verglichen mit dem Ergebnis in vitro (■, Harm und Rupert 1970).

4. DISKUSSION

Folgende drei Eigenschaften sind charakteristisch für die photoenzymatische Reparatur:

- 1.) Nur ein Enzym (PRE) ist an der Reparatur beteiligt.
- 2.) Der Reparaturvorgang erfordert die Energie eines Photons aus dem langwelligen UV-Bereich.
- 3.) Es können ausschließlich Pyrimidindimere repariert werden.

Bei den bisher bekannten anderen Reparaturmechanismen (Excision-Reparatur und Rekombination-Reparatur) handelt es sich 1.) um Prozesse, bei denen mehrere Arten von Enzymen mitwirken

- 2.) kompliziertere Reparatur-Vorgänge, die verschiedene Arten von Schäden (auch durch ionisierende Strahlen induzierte Schäden in DNS und RNS) beseitigen.

Besonders die 2.) Eigenschaft der PhR macht in vitro Untersuchungen einfach. Durch Regulation der Photonenabgabe und Änderung der experimentellen Bedingungen wurden viele Informationen über die PhR ermittelt. Auch bei in vivo Untersuchungen kann diese Eigenschaft der PhR ausgenutzt werden. Aber zwei Probleme müssen beachtet und berücksichtigt werden, um aus Ergebnissen von in vivo Untersuchungen Schlüsse über die PhR-Vorgänge in einer Zelle ziehen zu können:

- a) die Auswirkung nichtphotoreaktivierbarer Schäden und
- b) die Auswirkung anderer Reparaturmechanismen.

· Diese Effekte wurden in dieser Arbeit berücksichtigt.

In den folgenden Abschnitten 4.1. und 4.3. werden ihre Auswirkungen diskutiert. Die Bedeutung nichtphotoreaktivierbarer Schäden in der Evolution wird in 4.5. abschließend kurz erwähnt. Über die Anzahl der PRE-Moleküle pro Zelle, sowie das Wirkungsspektrum der PhR wird in 4.2. und 4.5. diskutiert.

Die erhaltenen Ergebnisse werden mit Ergebnisse von anderen Organismen verglichen. Abschattungseffekt und Abtötungseffekt während der Experimente werden in 4.6. erwähnt. Weitere mögliche Anwendungen des Lasers werden in 4.5. diskutiert.

4.1. Modifiziertes Dose-Decrement und maximale PhR

Die Methode, das modifizierte Dose-Decrement zu bestimmen (3.3.4), ermöglicht eine Berechnung der UV-Dosis in vivo, die zur Herstellung der photoreaktivierten Schäden nötig ist, ohne Kenntnisse über den Effekt nicht-photoreaktivierbarer Schäden zu erfordern. Obwohl der Anteil nicht-photoreaktivierbarer Schäden an dem Gesamtschaden wahrscheinlich auch bei Hefen wie bei *E. coli* viel kleiner als der Anteil der photoreaktivierbaren Schäden ist, kann das formale Dose-Decrement nicht nur von der Zahl der Substrate und PRE-Moleküle, sondern auch von der Dunkelreparatur der nicht-photoreaktivierbaren Schäden abhängig sein. Das formale Dose-Decrement wird kleiner, wenn der Stamm nicht-photoreaktivierbare Schäden schlechter reparieren kann. Als nicht-photoreaktivierbare Schäden sind nicht nur Strangbrüche oder Wasseranlagerungen, sondern auch Pyrimidindimere anzusehen, die wegen der Nachbarschaft bestimmter Basensequenzen oder wegen zu dichter Aufeinanderfolge oder aus anderen Gründen nicht photoreaktivierbar sind. Die Überlebenswahrscheinlichkeit UV-bestrahlter und anschließend sofort bis zum Maximum photoreaktivierter Zellen zeigt, wie viele nicht-photoreaktivierbare Schäden durch Dunkelreparatur repariert werden können, da nach maximaler PhR keine photoreaktivierbaren Schäden vorhanden sind. Abb. 47 stellt ein Schema der Reparaturen photoreaktivierbarer und nicht photoreaktivierbarer Schäden bei zwei Stämmen mit unterschiedlichem Reparaturvermögen dar. Ein Stamm (A), der UV-empfindlicher als der andere ist, bekommt durch UV-Bestrahlung mit der

Dosis D_1 N_1 nicht-photoreaktivierbare Schäden und N_2 photoreaktivierbare Schäden, die später durch Dunkelreparatur von N_1 zu N_3 und von N_2 zu N_4 reduziert werden können. Die verbleibende Anzahl der Schäden nach der Dunkelreparatur beträgt $N_3 + N_4 = n$. In einer Zelle des anderen Stammes (B) (dabei bedeutet der Ausdruck "in Zelle" stets "in der DNS einer Zelle") verbleibt nach Dunkelreparatur die gleiche Zahl von Schäden, wenn die Zellen mit der UV-Dosis D_2 bestrahlt wurden.

Wie in Abb. 47 gezeigt wird, gibt es drei Möglichkeiten der Verteilung der nach Dunkelreparatur übrig gebliebenen photoreaktivierbaren und nicht-photoreaktivierbaren Schäden. Werden die UV-bestrahlten Zellen sofort bis zum Maximum photoreaktiviert und dann weiterhin dunkelrepariert, so wird die Anzahl der restlichen nicht-photoreaktivierbaren Schäden immer kleiner als n sein. Sie beträgt dann M_1 bei Stamm A und M_2 bei Stamm B. Entsprechender Poisson-Verteilung können die Verhältnisse von n und M_1 sowie M_2 in logarithmischer Darstellung gezeigt werden. Abb. 35 zeigt diese Verhältnisse bei zwei haploiden Stämmen (MB'1030-1A und S24-12c) und einem diploiden Stamm 2217. Wie in Abb. 20 und 21 gezeigt wurde, nehmen die Überlebenswahrscheinlichkeiten beider haploider Stämme mit und ohne PhR nahezu linear mit der UV-Dosis ab. Diese Linearitäten deuten an, daß bei beiden Stämmen der Anteil der durch Dunkelreparatur reparierten Schäden am Gesamtschaden ohne PhR sowie mit PhR mit zunehmender UV-Dosis im untersuchten Dosisbereich fast gleich bleibt. Daher kann man folgende Gleichung unter Benutzung eines stammabhängigen Parameters der Reparatur von nicht-photoreaktivierbaren Schäden (r) schreiben:

$$\frac{n}{a_1 D + a_2 D} = \frac{r M}{a_2 D} \quad (9)$$

Hier bedeuten n die Anzahl der nach Dunkelreparatur ohne

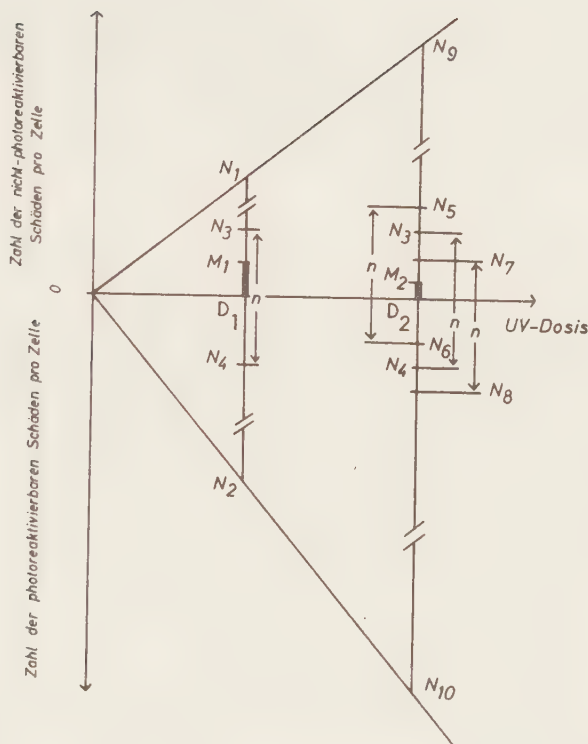


Abb. 47 Schematische Darstellung der Anzahl photoreaktivierbarer und nicht-photoreaktivierbarer Schäden in einer Zelle eines UV-empfindlichen Stammes nach UV-Bestrahlung mit der Dosis D_1 und in einer Zelle eines weniger UV-empfindlichen Stammes nach UV-Bestrahlung mit der Dosis D_2 . Für weitere Erklärungen siehe Text.

PhR übrig gebliebenen Schäden, M die Anzahl der nach Dunkelreparatur und maximaler PhR übrig gebliebenen nicht-photoraktivierbaren Schäden, a_1 die Anzahl der pro 1 J/m^2 produzierten photoreaktivierbaren Schäden und a_2 die Anzahl der pro 1 J/m^2 produzierten nicht-photoreaktivierbaren Schäden. n und M sind vom Stamm und der UV-Dosis abhängig und r ist Stamm-abhängig.
Aus Gleichung (9) ergibt sich

$$a_2 = \frac{a_1 r M}{n - r M} \quad (10)$$

Da wir zur Zeit nur die Anzahl der UV-induzierten Pyrimidindimere (320 ± 30 pro haploides Genom pro J/m^2 , Fäth und Brendel 1975) kennen, aber nicht wissen, wieviel Dimere davon photoreaktivierbar sind (das bedeutet, wieviele Dimere der gesamten Pyrimidindimere durch maximale PhR zu Monomeren aufgespalten werden können), und nicht auszuschließen ist, daß ein Teil der Pyrimidindimere wegen der vorher angegebenen Gründe nicht-photoreaktivierbar ist, kann a_1 auf folgende Weise ausgedrückt werden:

$$a_1 + k a_2 = 320 \quad (11)$$

Dabei stellt k den Anteil der Pyrimidindimere bei den nicht-photoreaktivierbaren Schäden dar.
Damit wird

$$a_2 = \frac{320 r M}{n - r M (1 - k)} \quad (12)$$

Wenn $r = 1$ und $k = 0$ sind, können photoreaktivierbare und nicht-photoreaktivierbare Schäden gleichmäßig durch Dunkelreparatur repariert werden. Werden nun alle durch UV-Bestrahlung entstandenen Pyrimidindimere bei maximaler PhR zu Monomeren umgewandelt, ergibt sich Gleichung (13).

$$a_2 = \frac{320 M}{n - M} \quad (13)$$

a_2 -Werte von MB 1030-1A und S24-12c können für $r = 1$ und $k = 0$ aus Abb. 35 berechnet werden. Sie sind in Tabelle 6 für $M = 1$ (MB 1030-1A) und $M = 0.5$ (S24-12c) angegeben. Bei anderen M -Werten ergeben sich für a_2 fast gleiche Werte, weil die M - und n -Werte beider Stämme fast linear mit zunehmender UV-Dosis zunehmen.

Tabelle 6 a_2 -Werte von MB 1030-1A und S24-12c bei $r = 1$ und $k = 0$

Stamm	M	UV-Dosis (J/m^2)	n	a_2
MB 1030-1A	1	0.7	3.95	109
S24-12c	0.5	6.3	5.11	35

Wenn r kleiner als 1 ist, also nicht-photoreaktivierbare Schäden bei Dunkelreparatur schlechter als photoreaktivierbare Schäden repariert werden können, und k größer als 0 (ein Teil der Pyrimidindimere also nicht-photoreaktivierbar ist), ist a_2 kleiner als oben angegeben. Bei Stamm S24-12c bedeutet das, daß weniger als 9.9 % ($35 / (35 + 320)$) des Gesamtschadens nicht-photoreaktivierbar sind. Patrick hat berichtet (1972), daß nach Bestrahlung mit langwelligem UV unter Benutzung von Acetophenon auch in Hefen ausschließlich Thyminindimere entstehen und Photoaktivierung nur 90 % Erfolg hat. Da Thyminindimere besser als andere Pyrimidindimere photoreaktiviert werden können (Setlow 1966), müssen nach Patricks Ergebnissen mehr als 10 % der Pyrimidindimere, die durch UV-Bestrahlung einer Zelle in der DNS entstehen, nicht-photoreaktivierbar sein. Wenn 10 % der Pyrimidindimere wirklich nicht-photoreaktivierbar sind, kann a_2 aus der Gleichung (10) berechnet werden (bei $r = 1$ ist $a_2 = 31$). In diesem Fall sind fast

alle nicht-photoreaktivierbaren Schäden nicht-photoreaktivierbare Pyrimidindimere. Drei mögliche Ursachen können zur Erklärung herangezogen werden:

1. Nicht-photoreaktivierbare Pyrimidindimere machen in Wirklichkeit noch weniger als 10 % aller Pyrimidindimere aus.
2. In dem verwendeten UV-Bereich entstehen kaum nicht-photoreaktivierbare Schäden außer Pyrimidindimeren.
3. Der Stamm S24-12c kann besser nicht-photoreaktivierbare Schäden als photoreaktivierbare Schäden reparieren ($r > 1$).

Die dritte Ursache kann nicht ausgeschlossen werden, weil S24-12c ein Excision-Reparaturunfähiger Stamm ist, und die Wirkungsweisen anderer Reparaturmechanismen zur Zeit noch wenig bekannt sind. Es ist trotzdem wahrscheinlicher anzunehmen, daß r -Werte des Stammes S24-12c etwa 1 sind. Unter dieser Annahme beträgt der Teil der nicht-photoreaktivierbaren Schäden am Gesamtschaden 10 %. Wenn ähnliche Untersuchungen mit *E. coli* durchgeführt werden, kann der Reparaturunterschied zwischen nicht-photoreaktivierbaren und photoreaktivierbaren Schäden bei unterschiedlichen Stämmen festgestellt werden, denn bei *E. coli* ist die Verteilung der verschiedenen Schäden bei UV-Bestrahlung schon untersucht worden (Setlow 1964).

Wenn der oben angegebene a_2 -Wert von S24-12c stimmt, dann muß der a_2 -Wert von MB 1030-1A gleich sein, weil es bei den a_1 - und a_2 -Werten keine Unterschiede zwischen den Stämmen geben sollte. Aus Gleichung (10) ergibt sich ein r -Wert für MB 1030-1A von 0.39 bei $k = 0$, von 0.38, wenn 10 % der Pyrimidindimere nicht-photoreaktivierbar sind. Diese Werte bedeuten, daß bei MB 1030-1A das $1 / 0.39 - 1 / 0.38$ ($2.56 - 2.63$)-fache an nicht-photoreaktivierbaren Schäden nach maximaler PhR plus Dunkelreparatur übrig bleiben als bei S24-12c. Das Dose-Decrement der PhR ist deswegen nicht nur von der Anzahl der photoreaktivier-

ten Schäden, sondern auch von der Dunkelreparaturfähigkeit des Stammes abhängig.

Die Methode zur Gewinnung des Dose-Decrements, durch die die Wirkung nicht-photoreaktivierbarer Schäden ausgeschaltet wird, kann allerdings nur angewandt werden, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind:

1. Die Fraktionierung der UV-Dosis in zwei Teile muß ohne Wirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit sein.
2. Außer PhR darf die PhR-Bestrahlung zwischen den beiden UV-Dosen keine Effekte zeigen.

Die Wirkungen fraktionierter Röntgen- oder UV-Bestrahlungen auf das Überlebensverhalten wurden bisher bei verschiedenen Organismen untersucht und dahingehend interpretiert, daß die Anwesenheit energiereicher Metaboliten für den Fraktionierungseffekt notwendig ist (Howard 1968, Kiefer 1971). Ein positiver Fraktionierungseffekt (d.h. Anstieg der Koloniebildungsfähigkeit bei Spaltung der Dosis) bei diploiden *Saccharomyces*-Zellen (diploider Wildtypstamm) wurde beobachtet, wenn das Nährmedium Glukose enthielt (Kiefer 1971). In unseren Experimenten hat der diploide Stamm 2094 einen negativen Fraktionierungseffekt gezeigt, wenn das Intervall zwischen zwei Bestrahlungen länger als 20 Min. wird (Abb. 27). Auch der haploide Stamm S 24-12c zeigt einen leicht negativen Fraktionierungseffekt, wenn das Intervall länger als zwei Stunden wird (unveröffentlichtes Ergebnis). Im Gegensatz zu diesen Stämmen zeigen der haploide Stamm MB 1030-1A und der diploide Stamm 2217 einen leicht positiven Fraktionierungseffekt, wenn das Intervall länger als zwei Stunden wird (unveröffentlichtes Ergebnis). Da ein positiver sowie ein negativer Fraktionierungseffekt bei der Bestimmung des modifizierten Dose-Decrements unerwünscht ist, wurden sie nicht weiter untersucht. Es sei jedoch betont, daß die Stammabhängigkeit des Fraktionierungseffekts bei der UV-Bestrahlung bei Anwendung dieser Methode stets ermittelt werden muß.

Der Photoprotektionseffekt, ein Schutzeffekt durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht vor der Bestrahlung mit kurzwelligem Licht, wurde bisher in *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* deutlich ausgeprägt gefunden und als ein Verzögerungseffekt der Zellteilung interpretiert, durch den dem Dunkelreparaturmechanismus mehr Reaktionszeit gegeben ist (Jagger und Stafford 1965). Das Wirkungsspektrum der Photoprotektion in *E. coli* stimmt mit dem Wirkungsspektrum der Zellteilungsverzögerung überein und zeigt sein Maximum bei 330 - 340 nm (Jagger et al. 1964). In unseren Experimenten wurde trotz der Benutzung eines Plastikfilters, der nur Licht mit einer Wellenlänge > 390 nm durchläßt, eine Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Vorbestrahlung vor der UV-Bestrahlung beim diploiden Stamm 2217 deutlich beobachtet. Bei zwei haploiden Stämmen zeigte sich fast keine Zunahme des Überlebens nach Vorbestrahlung mit PhRs-Licht. Unterschiedliche Effekte durch Vorbestrahlung mit PhR-Licht bei unterschiedlichen Stämmen sind zu verstehen, wenn die Dunkelreparaturmechnismen der Stämme dadurch beeinflußt werden.

4.2. Anzahl der PRE-Moleküle in haploider und diploider Zelle

Bestimmungen der Zahl der PRE-Moleküle von *E. coli* wurden bisher mehrfach vorgenommen (siehe Tabelle 7). Mutanten wurden gefunden, die mehr PRE-Moleküle pro Zelle als der normale *E. coli* Stamm B_{s-1} besitzt (PRE ++) (Harm 1969), und andere, die keine PRE besitzt (PRE -) (Harm und Hildebrandt 1962).

Bei *Saccharomyces* gibt die Zahl der PRE-Moleküle hier nur die PRE-Moleküle an, die die Photoreparatur nuklearer DNS-Schäden bewirken. Wie bei anderen eukaryontischen Zellen (Cook 1972) kann man vermuten, daß PRE-Moleküle nicht nur im Kern, sondern auch in anderen Teilen der Zelle, z.B. in den Mitochondrien, vorhanden sind.

Tabelle 7 Die Anzahl der PRE-Moleküle pro E. coli und pro Saccharomyces Zelle.

Stamm	die Zahl der PRE-Moleküle
E. coli B _{S-1}	20 (Harm 1968)+ 10 (Muraoka und Kondo 1969)‡
B _{S-1} -120	43 (Harm 1969)+
B _{S-1} -12	75 (Harm 1969)+
B _{S-1} -160	110 (Harm 1969)+
Saccharomyces (PRE für DNS-Reparatur)‡	
Haplont MB 1030-1A	350
S24-12c	350
Diplont 2217	640

+ durch Dose-Decrement von Blitz-PhR

‡ durch kontinuierliche PhR des kompetitiven Phagen in E. coli B_{S-1}

‡ durch modifiziertes Dose-Decrement von Blitz PhR

Die Anzahl der PRE-Moleküle, die durch die Modifizierung des Dose-Decrements in dieser Arbeit erhalten wurde, ist daher nicht identisch mit derjenigen, die in Versuchen mit Hefeextrakt zu bestimmen versucht worden ist (Cook 1974). Im allgemeinen findet man sowohl in E. coli als auch in Saccharomyces eine recht geringe Anzahl von PRE-Molekülen,

die DNS-Schäden mit Hilfe der Photonenenergie reparieren können. Diese Tatsache kann durch einen effektiven Photoreparaturmechanismus und eine hohe Stabilität der PRE-Moleküle erklärt werden. Es erscheint sinnvoll anzunehmen, daß die Anzahl der PRE-Moleküle davon abhängt, wie viele Chromosomen vorhanden sind, wie groß der Raum ist, in dem die Enzyme verteilt sind, wie effektiv ein Enzym mit seinem Substrat einen Komplex bilden und das Substrat spalten kann, und wie effektiv schließlich andere Reparaturmechanismen sind.

Wenn wir die DNS-Menge von *E. coli* mit der von haploiden und diploiden *Saccharomyces* Zellen vergleichen, erkennt man eine Zunahme des DNS-Gehalts pro Zelle, die allerdings nicht in gleicher Relation wie die Zunahme der PRE-Moleküle pro Zelle erfolgt (siehe Tabelle 8). Da das Volumen einer *E. coli* Zelle und das Volumen des Kerns einer haploiden *Saccharomyces* Zelle sich etwa entsprechen, folgt, daß die Anzahl der PRE-Moleküle pro Volumeneinheit bei *Saccharomyces* viel größer ist als bei *E. coli*, wenn die PRE-Moleküle, die DNS-Schäden von *Saccharomyces* Zellen reparieren, nur im Kern vorhanden sind. Es muß allerdings damit gerechnet werden, daß PRE-Moleküle auch im Cytoplasma vorhanden sind. So wurde berichtet (Cook 1972), daß in einem Mitochondrien-Extrakt, der nach UV-Bestrahlung von *Xenopus* Zellen isoliert worden ist, durch Bestrahlung mit PhRs-Licht die Thymindimer-Fraktion abnimmt und sogar die spezifische Aktivität der PRE im Mitochondrienprotein etwas größer als die im Kern-Protein ist. Waters und Moustacchi (1974) haben berichtet, daß durch UV-Bestrahlung in Mitochondrien-DNS von *Saccharomyces* Zellen entstandene Pyrimidindimere durch sichtbares Licht in Monomere verwandelt werden können. Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, daß keine Pyrimidindimere in Mitochondrien durch den Excision-Reparatur-Mechanismus repariert werden können (Waters und Moustacchi 1974), deuten an, daß auch in Mitochondrien PRE-Moleküle vorhanden sind und eine bedeutende Rolle bei der Reparatur der Pyrimidindimere spielen.

Tabelle 8 Angaben über DNS-Gehalt, Zellvolumen, Kernvolumen und PRE-Moleküle in *E. coli* und *Saccharomyces* Zellen

	<i>E. coli</i>	<i>Saccharomyces</i> (Haplont)	<i>Saccharomyces</i> (Diplont)
DNS-Gewicht	4.7×10^{15} g/Zelle *	1.8×10^{14} g/Zelle **	3.4×10^{14} g/Zelle **
Volumen einer <i>E. coli</i> Zelle (Durchschnitt)	$0.4 \mu\text{m}^3$	—	—
Volumen des Zellkerns von <i>Saccharomyces</i>	—	$0.3 \mu\text{m}^3$ ***	—
Anzahl der PRE-Moleküle	20	350	640
Dichte der PRE-Moleküle	50 Moleküle/ μm^3	1200^+ Moleküle/ μm^3	—

+ wenn angenommen wird, daß die 350 PRE-Moleküle nur im Kern vorhanden sind.

* (Cairs 1962)

** (Laskowski et al. 1960)

*** (Mundker 1960)

4.3. Abnahme der Photoaktivität durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung

Stamm MB 1030-1A zeigt eine Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeit, wenn die mit UV bestrahlten Zellen in Puffer im Dunkel gehalten werden. Dieser sog. "Negative-Liquid-Holding-Recovery" (NLHR) Effekt ist schon bei anderen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* gefunden worden (Kilbey 1969, Parry und Parry 1969). Als eine mögliche Erklärung für den NLHR-Effekt wurde von Parry (1972) vorgeschlagen, daß eine Verringerung der Aktivität eines Enzymsystems, das nicht-photoreaktivierbare Schäden repariert, während der Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung stattfindet. Daß die Zahl der photoreaktivierbaren Schäden pro Zelle keinen Einfluß auf das NLHR gibt, zeigen auch die Ergebnisse von Abb. 41a bis 41c. Von den zwei Linien, die die Änderung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch Puffer-Haltung bis 6 Tage nach UV-Bestrahlung angeben, ist eine von mit einem Blitz 40 Min. nach UV-Bestrahlung photoreaktivierten Zellen gewonnen worden, die andere entstammt nicht-photoreaktivierten Zellen. Diese zwei Linien laufen parallel bei drei verschiedenen UV-Dosen und zeigen damit an, daß die PhR keinen Einfluß auf das NLHR hat.

Die Abnahme des relativen Dose-Decrements (Dose-Decrement von PhR durch einen Blitz/Dose-Decrement von maximaler PhR) mit der Zeit der Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung zeigt entweder eine Abnahme der Effektivität des Enzyms bei der Aufspaltung des Komplexes oder eine Änderung des Substrats an. Bei *E. coli* wurde berichtet, daß nur eine $uvr^+ rec^+$ Stamm NLHR und PhR-Abnahme durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung zeigt, und daß diese Abnahme des Dose-Decrements von maximaler PhR durch Puffer-Haltung so schnell ist, daß es 24 Stunden nach UV-Bestrahlung keine Zunahme des Überlebens durch PhR mehr gibt (Moss und Davies 1974). Die Abnahme des Dose-Decrements nach maximaler PhR durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung bei

unserem Hefestamm ist nur 30 % nach 6 Tagen Puffer-Haltung. Dieser Verlust der Photoreaktivität wurde schon von Kelner (1949) entdeckt aber erst von Moss und Davies (1974) zu erklären versucht. Wenn PhR direkt nach UV-Bestrahlung stattfindet, wird die Dichte der Dimeren in der DNS so reduziert, daß durch den Excision-Repair-Mechanismus auch Schäden repariert werden, die sehr dicht nebeneinander liegen und ohne PhR nicht durch Excision-Repair repariert werden können. Werden die Zellen vor der PhR im Puffer gehalten, findet Excision in den dicht nebeneinander liegenden Bereichen während der Puffer-Haltung statt. Dabei kann die Reparatur jedoch infolge der Dichte der Schadenstellen nicht vollendet werden, und die Zellen werden daher inaktiviert. Diese Erklärung von Moss und Davies über den Verlust der Photoreaktivität ist für unseren Fall ungeeignet, weil die verwendete UV-Dosis zu gering für die Bildung sehr dicht nebeneinander liegender Schäden ist, und weil Stamm MB 1030-1A Excision-Repair defizient ist.

In der jüngsten Zeit wurde über eine sehr hohe Stabilität des PRE von *E. coli* während der Puffer-Haltung berichtet (Harm 1976). Bei Zimmertemperatur 23 °C nimmt die Zahl der aktiven PRE-Moleküle nach 30 Tagen Puffer-Haltung nur um etwa 20 % ab. Beim Stamm MB 1030-1A wurde eine Abnahme der Zahl der aktiven PRE-Moleküle nach 6 Tagen Puffer-Haltung nicht beobachtet (Yasui, unveröffentlichtes Ergebnis 1974). Diese Stabilität des PRE-Moleküls während der Puffer-Haltung deutet an, daß die Abnahme des Dose-Decrements durch eine Blitz-PhR durch Puffer-Haltung nach UV-Bestrahlung nicht durch Veränderung des PRE-Moleküls verursacht wird, sondern durch Veränderungen am Substrat. Die Reaktionskonstanten k_1 und k_2 sowie die photolytische Konstante können durch Veränderungen des Substrates beeinflusst werden. Diese Veränderung am Substrat könnte durch die übrigen Dunkelreparaturmechanismen verursacht werden. Weitere Untersuchungen von Reaktions- und photolytischen Konstanten mit verschiedenen Stämmen mit unterschiedlichen Dunkelreparaturmechanismen können hier weitere Klärung schaffen.

4.4. Die Reaktionskonstanten bei Bildung und Spaltung des Enzym-Substrat-Komplexes

In vitro wurde bewiesen, daß die Reaktionskonstanten k_1 und k_2 von Temperatur und Ionenstärke abhängig sind (Harm et al. 1971). Unser Ergebnis zeigt auch zunehmende k_1 -Werte mit zunehmender Temperatur in vivo. Die Aktivierungsenergie, die aus der Arrhenius Gleichung $k = A \exp (- E/RT)$ (A: Aktionskonstante, R: Gaskonstante, T: absolute Temperatur und k: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante), experimentell bestimmt werden kann, ergibt sich zu 5.3 kcal bei der Komplexbildung in Saccharomyces Zellen. In vitro und in vivo mit E. coli wurde bestätigt, daß die Entropie bei der Komplexbildung zunimmt (Harm et al., 1971). Die hohe Stabilität eines Komplexes wurde dabei durch eine große Zunahme der Entropie bei der Komplexbildung erklärt.

In unserer Reihe der PhR-Experimente wurde auch versucht, k_2 in vivo zu bestimmen, so wie dieser Wert bei E. coli mit Hilfe von Kaffein-Behandlung bestimmt worden ist (Harm 1970). In diesen Experimenten wurde Kaffein als PhR-Inhibitor benutzt, das in UV-bestrahlte Zellen mit photoreaktivierbaren Substraten feste Komplexe bildet und damit verhindert, daß PRE-Moleküle neue Komplexe mit Substraten bilden können. Bei Saccharomyces Zellen liegt die DNS im Kern und es ist daher fraglich, ob Kaffein bis in den Kern eindringen kann. In unseren Ergebnissen hatte Kaffein keine Wirkung auf den PhRseffekt.

Der Unterschied zwischen den k_1 -Werten, die direkt nach UV-Bestrahlung gemessen worden sind, und denen, die nach Applikation von einem Lichtblitz nach maximaler Komplexbildung nach UV-Bestrahlung gemessen worden sind, ist schwer zu erklären. Wenn PREsaktivität durch Komplexbildung und Aufspaltung des Komplexes nicht geändert wird, muß eine neue Komplexbildung unverändert oder etwas schneller als die erste Komplexbildung nach UV-Bestrahlung

erfolgen, weil die Verteilung der PRE-Moleküle vor UV-Be- strahlung im Kern nach einer Komplexbildung nicht mehr zufällig sein kann, denn die DNS ist sicherlich nicht ganz zufällig im Kern verteilt und die Verteilung der Di- mere in UV bestrahlter DNS ist auch nicht rein zufällig (Brunk und Hanawalt 1969, Brunk 1973). Wenn unser Ergebnis richtig ist, dann kann es eine mögliche Erklärung geben, nämlich eine Reduzierung der Aktivität des PRE-Moleküls durch PER (photoenzymatische Reparatur). Diese Unter- suchung muß noch weiter fortgesetzt werden.

4.5. Die Anwendung von Lasern bei der PhR und das Wirkungsspektrum der PhR

4.5.1. Überblick über die medizinischen, biologischen An- wendungen von Laserstrahlen

Der Laser ist in den letzten Jahren zu einem Präzisions- instrument entwickelt worden, auf das anfangs nur die Phy- siker, die den Laser in der Optik als kohärente Lichtquelle hoher Qualität verwendeten, heute aber auch Chemiker, Medi- ziner und Biologen angewiesen sind. Die bisherigen medi- zinischen und biologischen Anwendungen können in folgende drei Bereiche eingeteilt werden.

- (1) Anwendungen von hoher Strahlendichte zur Zerstörung eines Gewebes: Die hohe Strahlendichte des fokussierten Laserstrahles wird bisher am intensivsten zum Zer- stören von Gewebe benutzt.
- (2) Anwendung der Einfarbigkeit des Lasers: Da die Absorption der verschiedenen gefärbten Gewebeteile oder Moleküle von der Wellenlänge des Lichtes abhängig ist, kann man spezifische Gewebeteile oder Moleküle einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge absorbieren lassen und chemische oder biologische Änderungen beobachten.
- (3) Anwendung von Kohärenzeigenschaften: Wegen der fest- gelegten und regelmäßigen Schwingung des Laser-Lichtes können bei den großen Eiweißmolekülen bestimmte

Schwingungen angeregt werden, die zur Zerstörung von molekularen Bindungen führen können.

Bei zytologischen und zytogenetischen Untersuchung, für die der am Mikroskop angesetzte Laser (Lasermikroskop) entwickelt wurde und verwendet wird, wird die oben genannte erste und zweite Wirkung ausgenutzt.

Die Anwendung von Laserstrahlen zur Photoreaktivierung UV-bestrahlter Hefezellen fällt in die zweite Kategorie der oben eingeteilten Anwendungsbereiche des Laserstrahles.

4.5.2. PhR durch Laserblitz

Die Untersuchung der PhR mit Hilfe von Laserlicht bringt folgende Vorteile.

- (1) Wegen des intensiven und monochromen Laserlichtes kann die PhR von UV-bestrahlten Hefezellen leichter als mit einem Monochromator durchgeführt werden. Durch Änderung des Farbstoffes kann auch das Wirkungsspektrum der PhR in vivo bestimmt werden.
- (2) Wegen des sehr kurzen Impulses eines Laserblitzes (etwa 10^{-8} s), der die gerade in diesem Augenblick vorhandenen ES-Komplexe aufspaltet, kann eine quantitative Messung der PhR ermöglicht oder erleichtert werden.
Außerdem wird es auch möglich, infolge der hohen Strahledichte und eventuell auch der Kohärenzeigenschaften des Laserstrahles den Mechanismus der PhR noch weiter aufzuklären.

Der Unterschied des Wirkungsspektrum im Bereich kürzerer Wellenlängen zwischen in vivo und in vitro Experimenten kann nicht durch die Absorbierung von Photonen durch andere Bauteile der Zelle erklärt werden, da die Absorptionswahrscheinlichkeit eines Photons mit einer Wellenlänge von 337 nm durch eine Zelle unter 10 % liegt.

Eine mögliche Erklärung für die niedrige Photoreaktivität von Photonen von Laserblitzen in Wellenlängen unter ca. 350 nm liegt in der Eigenschaft dieser Photonen, in diesem Wellenlängenbereich sowohl zu photoreaktivieren als auch zu inaktivieren. Da die PhR bei der Berechnung stets auf Kontroll-Zellen, die ohne UV-Bestrahlung mit Laserblitzen belichtet wurden, bezogen wurde, gibt es keine Inaktivierungswirkung bei der PhR, aber es könnte möglich sein, daß wegen der dichten Photonen und der Inaktivierungseigenschaft der Photonen aus Laserblitzen, die Aufspaltung des Komplexes durch ein Photon durch andere Photonen behindert wird. Um das zu prüfen, könnten eine Änderung der Intensität des Laserblitzes oder in vitro Experimente mit Laserblitzen weiter helfen. Für die Entschlüsselung des unbekannten Molekularmechanismus der PhR kann eine Laser-Blitz PhR noch viele Möglichkeiten bieten.

Das Wirkungsspektrum der PhR von *Saccharomyces cerevisiae* wird in Abb. 48 mit Wirkungsspektren bei anderen Lebewesen verglichen. Diese Ergebnisse in vivo können durch die Wellenlängen mit maximaler PhR in zwei Gruppen unterteilt werden, nämlich in die 430 nm Gruppe (*Streptomyces*, *Agmenellum*), die in der Nähe der Wellenlänge von 430 nm eine maximale PhR zeigen, und in die 370 nm Gruppe (*E. coli*, *Euglena*). Das PRE des *Streptomyces* kann außer Dimeren vom Cyclobutan-Typ auch ein anderes Photoprodukt, 6-4'-

Pyrimidin-2'-1 -Thymin (CPO-T), reparieren (Ikenaga et al. 1971). Das PRE von *Saccharomyces* gehört offensichtlich zu der letzten Gruppe der PRE, die nur Cyclobutan-Typ Dimere aufspalten kann. Diese Einteilung der Organismen nach dem Wirkungsspektrum des PRE sowie auch die Einteilung der Organismen nach dem Vorkommen des PRE erbringen viele Informationen über die Evolution. Man kann vermuten, daß während der Evolution viele Organismen PRE enthalten haben, das primitive Bakterien schon früher gewonnen hatten. Unter den Organismen gab es einige, die wegen ihrer Lebensumstände ein anderes PRE-Gen bekommen oder

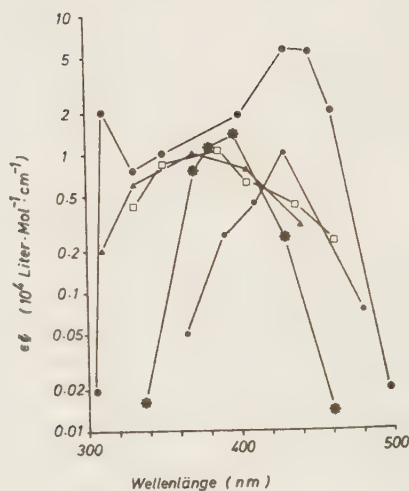


Abb. 48 Wirkungsspektrum der PhR in vivo bei verschiedenen Organismen. Streptomyces (●: Jagger et al. 1970), E. coli (▲: Kondo und Kato 1966), Euglena (□: Schiff et al. 1961), Agmenellum (●: van Baalen 1968) und Saccharomyces (*).

deren PRE-Gen sich verändert wie bei *Streptomyces* oder *Agmenellum*. Eine genauere Untersuchung des Wirkungsspektrum der PhR von verschiedenen Organismen könnte eine weitere Einteilung der Evolution ermöglichen.

Man muß auch die nicht-photoreaktivierbaren Schäden beachten, die in der Anfangsphase der Evolution eine große Rolle gespielt haben können. Besonders ist der Beitrag zur Mutation nicht-photoreaktivierbarer Pyrimidindimere zu beachten, weil diese ein großer Teil der nicht-photoreaktivierbaren Schäden sein können (siehe S. 81). Nach Eckardt (1974) mutiert der S24-12c Stamm häufiger, wenn er photoreaktiviert wurde.

4.6. Über den Abschattungseffekt bei UV-Bestrahlung

Der Abschattungseffekt von UV-bestrahlten Zellen wurde schon von Morowitz (1950) untersucht. Die durchschnittlich UV-Dosis kann durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$I = I_0 (1 - e^{-nsx}) / nsx \quad (12)$$

Hier bedeuten I_0 die UV-Dosis an der Oberfläche der Suspension, n die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit, s Absorptionsquerschnitt einer Zelle und x die Dicke der Suspension. Wegen der unterschiedlichen Größe der Zellen in einer Suspension und des Rührungsunterschiedes bei der UV-Bestrahlung kann man den Abschattungseffekt praktischer und besser experimentell bestimmen. Nach Haefner (1965) können Hefezellen bis zu einem Titer von $10^5/0.1$ ml ohne erkennbare Abschattungseffekte bestrahlt werden. Unsere Ergebnisse zeigten, daß man schon ab 3×10^4 Zellen / 0.1 ml bei großen haploiden Zellen mit Abschattungseffekten rechnen muß. Bei diploiden Zellen muß

man mit noch größeren Abschattungseffekten als bei haploiden Zellen rechnen, da diploide Zellen wesentlich größer als haploide Zellen sind. Wie von Smith und Hanawalt (1969) beschrieben, wird eine Rührung der Suspension während der Bestrahlung sehr wichtig, wenn der Bestrahlungstitler den oben gegebenen Wert überschreitet. Dann erhalten die Zellen in den unteren Schichten während der Bestrahlung niedrigere UV-Dosen und erscheinen daher UV-resistenter. Die Möglichkeit zur Diagnostizierung einer falschen UV-Sensibilität ergibt sich bei extrem UV-sensiblen Stämmen häufig, weil die Zellen trotz Rührung der Suspension während der Bestrahlung nur ganz kurz bestrahlt werden. In diesen Fällen muß die UV-Dosis verringert und die Bestrahlungsdauer verlängert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Photoreaktivierung in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen untersucht. Durch Anwendung von kontinuierlichem PhR-Licht, Blitzlicht aus Elektronenblitzgeräten und Blitzlicht aus Laser wurden folgende Ergebnisse über die PhR haploider und diploider *Saccharomyces* Zellen mit unterschiedlicher UV-Empfindlichkeiten erzielt.

- (1) Durch Anwendung von Lichtblitzen eines Elektronenblitzgerätes konnte die zur maximalen Komplexbildung zwischen Photoreaktivierungsenzymen und Substraten nach UV-Bestrahlung notwendige Zeit bestimmt werden. Bei haploiden sowie diploiden Zellen sind 70 % der Komplexe 1 Min. nach UV-Bestrahlung schon gebildet, aber etwa 15 Min. sind nötig zur maximalen Komplexbildung.
- (2) Die Abhängigkeit der PhR von der Intensität des Lichtblitzes wurde untersucht. Dabei zeigt sich:
 - (a) eine maximale Blitz-PhR kam durch einen Blitz aus einem Elektronenblitzgerät bei einem Abstand

- von 8 cm (oder weniger) zwischen der Frontscheibe des Gerätes und der Suspension erreicht werden.
- (b) Die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit durch eine Blitz-PhR nimmt mit zunehmender Intensität des Blitzes entsprechend einer theoretischen Kurve zu, bei der alle Treffer von Photonen auf Komplexe zufällig erfolgen (d.h. alle Komplexe haben gleich Reaktionsfähigkeit mit einem Photon).
- (3) Das Dose-Decrement (Dosis-Verringerung) durch die PhR eines Blitzes wurde bei zwei haploiden und zwei diploiden Stämmen bestimmt. Dabei zeigten alle Stämme unterschiedliche Werte zwischen $6.2 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ (bei dem UV-empfindlichsten haploiden Stamm MB 1030-1A) und $9.5 \times 10^{-1} \text{ J/m}^2$ (bei dem UV-empfindlichsten diploiden Stamm S 2094).
- (4) Um die Wirkung nicht-photoreaktivierbarer Schäden auf das Dose-Decrement auszuschalten, wurde eine Methode eingeführt, in der eine bestimmte UV-Dosis in zwei Teile fraktioniert und zwischen den zwei Bestrahlungen die Zellen bis zum Maximum photoreaktiviert wurden. Dadurch konnte das Dose-Decrement ("modifizierte Dose-Decrement") bestimmt werden, das eine UV-Dosis bedeutet, in der die photoreaktivierbaren Schäden durch PhR annulliert wurden. Das modifizierte Dose-Decrement war für zwei haploide Stämme gleich (1.1 J/m^2) und für den diploiden Stamm 2217 war der Wert 0.9 J/m^2 . Für den anderen diploiden Stamm (S 2094) konnte kein modifiziertes Dose-Decrement ermittelt werden, da die Dosisfraktionierung einen Einfluß auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei diesem Stamm hat (1.6). Bei allen Stämmen ist das modifizierte Dose-Decrement größer als ohne Modifizierung. Die Zunahme durch Modifizierung ist von der Dunkelreparaturfähigkeit der nicht-photoreaktivierbaren Schäden der Stämme abhängig.
- (5) Die Anzahl der Photoreaktivierungsenzymmoleküle, die die photoenzymatische Reparatur nuklearer DNS-Schäden

bewirken, wurde aus dem modifizierten Dose-Decrement und dem Pyrimidindimerprodukt pro UV-Dosis zu 350 ± 80 für eine haploide *Saccharomyces* Zelle und zu 580 ± 110 für eine diploide Zelle bestimmt.

- (6) Während der Bestimmung des modifizierten Dose-Decrements wurde ein Stamm-abhängiger Fraktionierungseffekt (Anstieg oder Abfall der Koloniebildungsfähigkeit bei Fraktionierung der UV-Dosis innerhalb von drei Stunden) beobachtet. Eine Stammbabhängigkeit des Photoprotektionseffektes (Anstieg der Koloniebildungsfähigkeit bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht vor der Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht) wurde auch beobachtet. Bei der Ermittlung des modifizierten Dose-Decrements der haploiden Stämme wirkten sich diese Effekte in den verwendeten Zeiträumen nicht aus. Die Überlebenswahrscheinlichkeit des diploiden Stammes 2217 wurde nicht durch Dosisfraktionierung wohl aber etwas durch Photoprotektion beeinflusst.
- (7) Der Komplexbildungsfaktor k_1 direkt nach der UV-Bestrahlung wurde für haploide und diploide Zellen bestimmt. Bei Zimmertemperatur beträgt k_1 3.12×10^{-5} Zellvolumen Molekül s^{-1} für Haplonten und 8.52×10^{-5} Zellvolumen Molekül s^{-1} für Diplonten. Die Temperaturabhängigkeit der k_1 -Werte wurde mit dem haploiden Stamm untersucht. Die Aktivierungsenergie bei der Komplexbildung wurde damit als 5.33 kcal Mol bestimmt. Der Grund für die viel niedrigeren k_1 -Werte im Vergleich mit den Werten von *E. coli* wurde diskutiert. Der Komplexbildungsfaktor nach Aufspaltung eines Komplexes wurde mit Hilfe eines Blitzgerätes untersucht. Dabei zeigt k_1 noch niedrigere Werte von 1.43×10^{-5} Zellvolumen Molekül s^{-1} 5 Sekunden nach einer Applikation eines Blitzes und 2.50×10^{-5} Zellvolumen Molekül s^{-1} 10 Sekunden nach einer Blitzapplikation. Die Abnahme der k_1 -Werte durch PhR deutet einen Verzögerungseffekt der PRE-Aktivität nach Auf-

spaltung eines Komplexes an.

- (.) Durch maximale PhR mit kontinuierlichem Licht wurden unterschiedliche Dunkelreparaturfähigkeiten nicht-photoreaktivierbarer Schäden bei zwei UV-empfindlichen Stämmen untersucht. Daß Stamm MB 1030-1A 2.6 mal schlechter nicht-photoreaktivierbare Schäden reparieren kann als S24-12c, entspricht der höheren Zunahme des Dose-Decrements durch Modifizierung von nicht-photoreaktivierbaren Schäden. Der Anteil der nicht-photoreaktivierbaren Schäden am Gesamtschaden, der durch UV-Bestrahlung in der DNS entsteht, wurde mit 10 % angesetzt, wenn Stamm S24-12c photoreaktivierbare und nicht-photoreaktivierbare Schäden gleichmäßig im Dunkel reparieren kann.
- (.) Durch Puffer-Haltung der mit UV bestrahlten Zellen von Stamm MB 1030-1A nimmt die Photoreaktivität bis zu 30 % 6 Tage nach der UV-Bestrahlung ab. Die Ursache dieser langsamen Abnahme der durch einen Lichtblitz photoreaktivierbaren Schäden liegt an dem Substrat, das während der Puffer-Haltung wahrscheinlich an Komplexbildungsfähigkeit verliert.
- (10) Durch Anwendung unterschiedlicher Farbstofflaser und neuartiger Bestrahlungseinrichtungen wurden die Abtötung und die Photoreaktivierung durch Laserstrahlen untersucht. Das Wirkungsspektrum der PhR wurde bestimmt und mit in vitro Ergebnissen von *Saccharomyces* und in vivo Ergebnissen von anderen Organismen verglichen. Eine weitere Anwendung der Laserstrahlen in PhR-Experimenten wurde diskutiert.
- (11) Der Abschattungseffekt bei UV-Bestrahlung wurde erneut untersucht. In Abhängigkeit von der Größe der bestrahlten haploiden Zellen liegt der maximale Titer ohne Abschattungseffekt bei UV-Bestrahlung zwischen $3 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml}$ und $1 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$ bei 5 mm langem Lichtweg in der Suspension. Ein stammabhängiger Abtötungseffekt durch Plastikschrälen bei Aufbewahrung der Zellen in derartigen Gefäßen wurde beobachtet.

LITERATURVERZEICHNIS

- | | |
|--|--|
| Anders, A.,
Yasui, A.,
Zacharias, H.,
Lamprecht, I.,
Laskowski, W., (1975) | Pulsed dye laser measurements of wavelength dependence of yeast photoreactivation in vivo after UV-irradiation.
In, Proceedings of the Conference on Radiation and Cellular Control Processes, (im Druck) |
| Averbeck, D.,
Laskowski, W.,
Eckardt, F.,
Lehmann-Brauns, E.,
(1970) | Four radiation-sensitive mutants of <i>Saccharomyces</i> .
Molec. Gen. Genet. 107, 117-127 |
| Baalen, van C. (1968) | The effects of ultraviolet irradiation on a coccoid blue-green alga: survival, photosynthesis and photoreactivation.
Plant. Physiol. 43, 1989-1995 |
| Beukers, R.,
Berends, W. | Isolation and identification of the irradiation product of thymine.
Biochim. Biophys. Acta 41, 550-551 |
| Brunck, C.F.,
Hanawalt, P.C. (1969) | The nature of the excision-repair region in the DNA from aneucaryotic organism, <i>Tetrahymena pyriformis</i>
Radiat. Res. 38. 285-295 |
| Brunck, C.F. (1973) | Distribution of dimers in ultraviolet-irradiated DNA.
Nature NB 241, 74-76 |
| Cairns, J. (1962) | A minimum estimate for the length of the DNA of <i>Escherichia coli</i> obtained by autoradiography.
J. Mol. Biol. 4, 407-409 |

- Cook, J.S. (1967) Direct demonstration of the monomerization of thymine containing dimers in UV-irradiated DNA by yeast photoreactivating enzyme and light.
Photochem. Photobiol. 6, 97-101
- Cook, J.S. (1970) Photoreactivation in animal cells.
In, Photophysiology (ed. A.C. Giese)
Academic Press, New York 5, 191-233
- Cook, J.S. (1972) In, Molecular and Cellular Repair-Processes (ed. R.F. Beers, Jr., R.M. Herriott and R.C. Tilghman)
79-94 John Hopkins University Press, Baltimore
- Cook, J.S.,
Proctor, W.R. (1974) Yeast deoxyribodipyrimidine photolynase (photoreactivating enzyme): Optimum conditions for activity and competitive inhibition.
Photochem. Photobiol. 19, 385-390
- Dulbecco, R. (1949) Reactivation of ultra-violet-inactivated Bacteriophage by visible light.
Nature (London) 163, 949-950
- Eckardt, F. (1974) Spontane und UV-induzierte Mutabilität von drei UV-sensiblen Saccharomyces Mutanten.
Dissertation, Freie Universität Berlin
- Fäth, W.W.,
Brendel, M. (1975) UV-induction of thymine-containing dimers in Saccharomyces cerevisiae.
Z. Naturforsch. 30c, 811-817

- Game, J.C.,
Mortimer, R.L. (1974) A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast.
Mutation. Res., 24, 281-292
- Goodgal, S.H.,
Rupert, C.S.,
Herriott, R.M. (1957) In, The chemical basis of heredity
ed. W.D. MacElroy und B. Glass)
341-350 Johns Hopkins University
Press, Baltimore, Maryland
- Haefner K. (1965) Untersuchung der Induktion proto-
tropher Mutanten durch ultraviolet-
tes Licht bei Saccharomyces in Ab-
hängigkeit von Dosis und Nachbar-
handlung.
Dissertation, Freie Universität
Berlin
- Harm, W.
Hillebrandt, B. (1962) A non-photoreactivable mutant of
E. coli B.
Photochem. Photobiol., 1, 271-272
- Harm, H.,
Rupert, C.S. (1968) Analysis of photoenzymatic repair
of UV-lesions in DNA by single
light flashes, I. In vitro studies
with Haemophilus influenzae trans-
forming DNA and yeast photoreacti-
vating enzyme.
Mutation Res., 6, 355-370
- Harm, W.,
Harm, H.,
Rupert, C.S. (1968) Analysis of photoenzymatic repair
of UV-lesions in DNA by single
light flashes, II. In vivo studies
with Escherichia coli cells

- and bacteriophage.
Mutation Res., 6, 371-385
- Harm, W. (1969) Analysis of photoenzymatic repair of UV-lesions in DNA by single flashes,
IV. Mutations affecting the number photoreactivating enzyme molecules in *E. coli* cells.
Mutation Res., 8, 411-415
- Harm, H.
Rupert, C.S (1970) Analysis of photoenzymatic repair of UV-lesions in DNA by single light flashes, VI. Rate constants for enzyme-substrate binding in vitro between yeast photoreactivating enzyme and ultraviolet lesions in *Haemophilus* transforming DNA.
Mutation Res., 10, 291-306
- Harm, W. (1970) Analysis of photoenzymatic repair of UV-lesions in DNA by single light flashes, V. Determination of the reaction-rate constants in *E. coli*.
Mutation Res., 10, 277-290
- Harm, W.,
Rupert, C.S.,
Harm, H. (1971) The study of photoenzymatic repair UV-lesions in DNA by flash photolysis.
In, Photophysiol (ed. A.C. Giese)
6, 279-324, Academic Press, New York
- Harm, W. (1976) Analysis of photoenzymatic repair of UV-lesions in DNA by single light flashes, X. Stability of the photoreactivating enzyme in resting

- Escherichia coli cells.
Mutation Res., 34, 69-74
- Ikenaga, M.,
Patrick, M.H.,
Jagger, J. (1971) Photoreactivation of killing in
Streptomyces, III. Action spectra
for photolysis of pyrimidine di-
mers and adducts in *S. griseus*
and *S. griseus* PHR-1.
Photochem. Photobiol. 14, 175-187
- Jagger, J. (1964) Photoprotection from far ultraviolet
effects in cells.
Advances Chem. Physics 7, 584-
- Jagger, J.,
Stafford, R.S. (1965) Evidence for two mechanisms of
photoreactivation in *Escherichia*
coli B.
Biophys. J. 5, 75-88
- Jagger, J.,
Takebe, H.,
Snow, J.M. (1970) Photoreactivation of killing in
Streptomyces: Action spectra and
kinetics studies.
Photochem. Photobiol. 12, 185-196
- Kelner, A. (1949) Photoreactivation of ultraviolet
irradiated *Escherichia coli* with
special reference to the dose re-
duction principle and to ultravio-
let-induced mutation.
J. Bacteriol. 58, 511-521
- Kilbey, B.J.,
Smith, S.M. (1969) Similarities between a uv-sensitive
mutant of yeast and a bacterial mu-
tant lacking excision-repair ability.
Molec. gen. Genet. 104, 253-257

- Kondo, S.,
Kato, T. - (1969) Action spectra for photoreactivation of killing and mutation to prototrophy in uv-sensitive strains of *Escherichia coli* possessing and lacking photoreactivating enzyme. Photochem. Photobiol. 5, 827-837
- Kondo, S. (1972) Molecular Radiation Biology (auf Japanisch)
Tokyo University Press, Tokyo
- Kowalski, S. (1975) Rekombinationsverhalten von drei UV-sensiblen *Saccharomyces*-Diplonten in Abhängigkeit der UV-Dosis und von verschiedenen Nachbehandlungen.
Dissertation, Freie Universität Berlin
- Laskowski, W. (1960) Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. I. Aufbau homozygoter Stämme und Dosiseffekt kurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde.
Z. Naturforschg. 15b, 495
- Laskowski, W.,
Lochmann, E.R.,
Wacker, A.,
Stein, W. (1960) Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. III. Biochemische Eigenschaften in Abhängigkeit von Ploidiegrad und Kombination der Paarungstypalle
Z. Naturforschg. 15b, 730-734

- Morowitz, H.J. (1950) Absorption effects in volume irradiation of microorganismus
Science 111, 229-230
- Moss, S.H.,
Davies, D.J.G. (1974) Interrelationship of repair mechanisms in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 120, 15-23
- Muhamed, A. (1966) Studies on the yeast photoreactivating enzyme. I. A method for the large scale purification and some properties of the enzyme.
J. Bio. Chem. 241, 516-523
- Mundker, B. (1960) Submicroscopic morphology of frozen-dried yeast.
Exp. cell Research 21, 201-205
- Muraoka, N.,
Kondo, S. (1969) Kinetics of enzymatic photoreactivation studies with phage T1 and *Escherichia coli* Bs-1.
Photochem. Photobiol. 10, 295-308
- Nüsse, M. (1973) Methode zur Gewinnung synchroner Hefezellen durch Selektion und ihre Grenzen.
Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe Universität zu Frankfurt am Main
- Parry, J.M.,
Parry, E.M. (1969) The effects of uv-light post-treatment on the survival characteristics of 21 sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
Mutation Res. 8, 545-556

- Lacey, J.M. (1972) A quantitative analysis of "Negative Liquid Holding", in some uv-sensitive mutants of yeast.
Molec. gen. Genet. 118, 33-45
- Patrick, M.H. (1972) Nature of repairable damage in DNA. Annual Report of the Division of Biology, University of Texas at Dallas
- Preteck, T.G. (1971) Estimation of experimental conditions that permit cell separations by velocity sedimentation on isokinetic gradients of Ficoll in tissue culture medium.
Analyt. Biochem. 41, 248
- Rupert, C.S. (1960) Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast.
J. Gen. Physiol. 43, 573-595
- Rupert, S.S. (1962a) Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I. Kinetics of the relation.
J. Gen. Physiol. 45, 703-724
- Rupert, C.S. (1962b) Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. II. Formation of an enzyme-substrat complex.
J. Gen. Physiol. 45, 725-741
- Schaarschmidt, B. (1972) Eine einfache Methode zur Bestimmung des Quantenflusses von Bestrahlungslampen im Wellenlängenbereich 2400 Å - 6000 Å.
Z. Naturforschg. 25b, 330-331

- Schiff, J.A.,
Lyman, H.,
Epstein, H.T. (1961) Studies of chloroplast development in Euglena. II. Photoreversal of the uv-inhibition of green colony formation.
Biochem. Biophys. Acta 50, 310-318
- Setlow, J.K. (1966) The molecular basis of biological effects of ultraviolet radiation and photoreactivation. In, Current Topics in Radiation Research, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 2, 195-248
- Setlow, J.K.,
Setlow R.B. (1963) The nature of the photoreactivable lesion in DNA.
Nature, 197, 560-562
- Setlow, R.B. (1964) In, Mammalian Cytogenetics and Related Problems in Radiobiology. (ed. C. Pavan et al.), s. 291
Pergamon Press, Oxford
- Setlow, R.B.,
Carrier, W.L.,
Bollu, F.J. (1965) Pyrimidine dimers in uv-irradiated poly dI:dC.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 1111-1118
- Setlow, J.K. (1966) Photoreactivation.
Radiation Res. Suppl. 6, 141-155
- Setlow, J.K. (1967) In, Comprehensive Biochemistry (ed. M. Florkin und E.H. Stolz), 27, 157, Elsevier, Amsterdam
- Smith, K.C.,
Hanawalt, P.C. (1969) Molecular Photobiology; inactivation and recovery. Academic Press
New York and London

- Sutherland, B.M. (1974) Photoreactivating enzyme from human leukocytes.
Nature, 248, 109-112
- Sutherland, J.C.,
Sutherland, B.M. (1975) Human photoreactivating enzyme, Action spectrum and safelight conditions.
Biophys. J. 15, 435-440
- Terry, C.E.,
Setlow, J.K. (1967) Photoreactivating enzyme from *Neurospora crassa*.
Photochem. Photobiol. 6, 799-803
- Unrau, P.,
Wheatcroft, R.,
Cox, B.S. (1971) The formation of pyrimidine dimers from DNA of ultraviolet-irradiated yeast.
Molec. gen. Genet. 113, 359-362
- Unrau, P.,
Wheatcroft, R.,
Cox, B.S.,
Olive, T. (1973) The formation of pyrimidine dimers in the DNA of fungi and bacteria.
Biochim. Biophys. Acta 312, 626-632
- Waters, R.,
Moustacchi, E. (1974) The fate of ultraviolet-induced pyrimidine dimers in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae* following various post-irradiation cell treatments.
Biochim. Biophys. Acta 366, 241-250
- Waters, R.,
Moustacchi, E. (1975) Dose dependence of the excision of ultraviolet-induced pyrimidine dimers from nuclear deoxyribonucleic acid of haploid and diploid *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol. 121, 901-906

- Witaker, D.M. (1941) Counteracting the retarding and inhibitory effects of strong ultraviolet on *Fucus* eggs by white light. *J. Gen. Physiol.* 25, 391-397
- Wulf, D.L.,
Rupert, C.S. (1962) Disappearance of thymine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from bakers' yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 237-240
- Yasui, A.,
Laskowski, W. (1975) Determination of the number of photoreactivating enzyme molecules per haploid *Saccharomyces* cell. *Int. J. Radiat. Biol.* 28, 511-518
- Yasui, A.,
Laskowski, W. (1976) The dependence of photoreactivating enzyme-substrate complex formation in *Saccharomyces* on liquid-holding treatment.
In, *Proceedings of the Conference on Radiation and Cellular Control Processes 1976* (im Druck)

LEBENS LAUF

Am 27. Dezember 1945 wurde ich als Sohn des Leiters einer Chemie-Firma Chujiro Yasui und seiner Frau Yoneko, geb. Kabeshima, in Osaka geboren.

Von 1951 bis 1964 absolvierte ich die Elementar-, Mittel- und Höhere-Schule in Osaka. Im März 1964 bestand ich die Eintrittsprüfung in die Technische Fakultät der Kyoto Universität. Nach vorläufiger Beendigung des Studiums bekam ich 1968 den "Bachelor of Engineering" und begann das Forschungsstudium an der gleichen Fakultät der Kyoto Universität. Im März 1971 nach Beendigung meiner Forschungen im physikalisch-mathematischen Laboratorium bekam ich den "Master of Engineering". Zum Wintersemester 72/73 wurde ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert, um Biophysik zu studieren.

Das Thema der vorliegenden Arbeit erhielt ich im Sommersemester 1973 von Herrn Prof. Dr. W. Laskowski.

Die Untersuchung für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit vom Sommersemester 1973 bis zum Wintersemester 1975/1976 am Zentral-Institut 5, Institut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Laskowski bin ich für das Thema, für ständige Betreuung, für großzügige Unterstützung und für die anregenden Diskussionen sehr verbunden und sehr dankbar.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Körber und Herrn Prof. Dr. A. Kaul aussprechen, die sich für mich darum bemüht haben, daß ich im Institut für Biochemie und Biophysik arbeiten kann, als ich nach Berlin kam.

Viele Mitglieder des Instituts haben mit ständiger Hilfsbereitschaft den Fortgang der Arbeit unterstützt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau E. Lehmann-Brauns, Frl. Dr. F. Eckardt und Frau Dr. S. Kowalski für ihre ständige Hilfsbereitschaft und viele anregende Gespräche.

Herzlich danke ich auch den Herren Dr. I. Lamprecht und Dr. B. Schaarschmidt für ihre ständige Hilfe in technischen experimentellen Fragen und für zahlreiche Gespräche, sowie Frau M. Brose und Herrn G. Bjeske, die sich um die technischen Vorbereitungen sorgten.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30